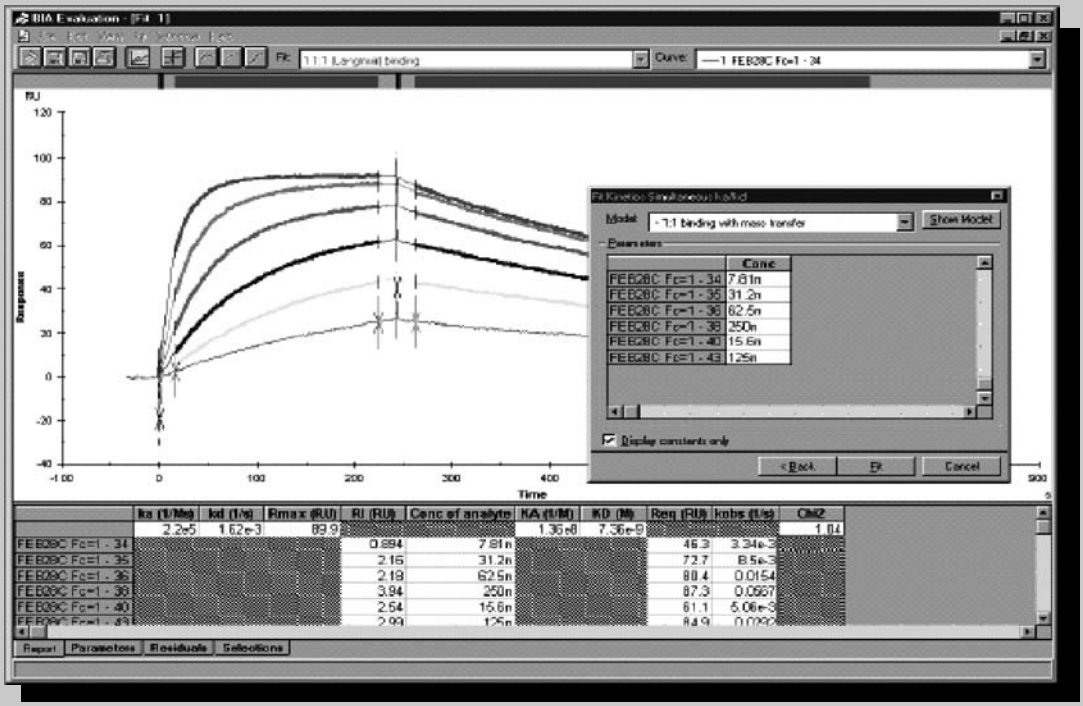
GE Healthcare

Biacore

BIAevaluation

Instrument Handbook



日本語取扱説明書

GE imagination at work

JJ-3010-04
(71-3206-31)

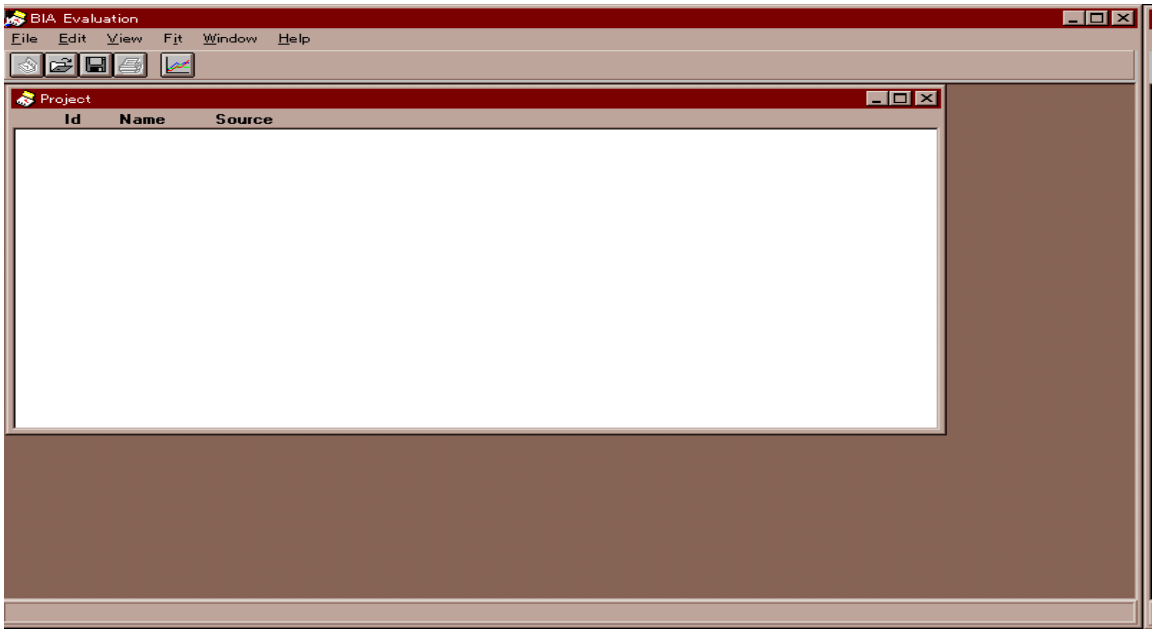
目　次

1. センサーグラムの編集 1
1-1. ソフトウエアの起動 1
1-2. ファイルの呼び出し 1
1-3. グラフ化 3
1-4. センサーグラムの編集 5
1-4-1. 不必要部分の削除 5
1-4-2. ベースライン(Y 軸)のあわせ方 6
1-4-3. 添加開始ポイント(X 軸)のあわせ方 7
1-4-4. 一本のセンサーグラムからの重ね書き 10
1-4-5. センサーグラムの引き算 13
1-5. その他 15
1-5-1. グラフのタイトル 15
1-5-2. センサーグラムの凡例 16
1-5-3. センサーグラムの色,その他表示の変更 18
1-5-4. グラフのスケール 19
2. センサーグラムからの反応速度定数の算出（Kinetics 解析） 20
2-1. 解説 20
2-1-1. 結合定数、解離定数と、反応速度定数 20
2-1-2. BIAevaluation による解析法 20
2-1-3. 解析の手順 22
2-2. 非線形解析 23
2-2-1. 同時解析－Global fitting による解析 23
2-2-2. 同時解析－Local fitting による解析 31
2-2-3. 同時解析の注意点 33
2-2-4. 分割解析 35
2-3. 線型解析 39
3. 平衡値からの解離定数の算出（Affinity 解析） 44
4. 濃度測定 49
4-1. 実験方法 49
4-2. 解析方法 51
4-2-1.ファイルの呼び出し 51
4-2-2. データの抽出 52
4-2-3.検量線の作成 52
4-2-4.未知濃度の算出 53
5. モデルの追加 54

1. センサーグラムの編集

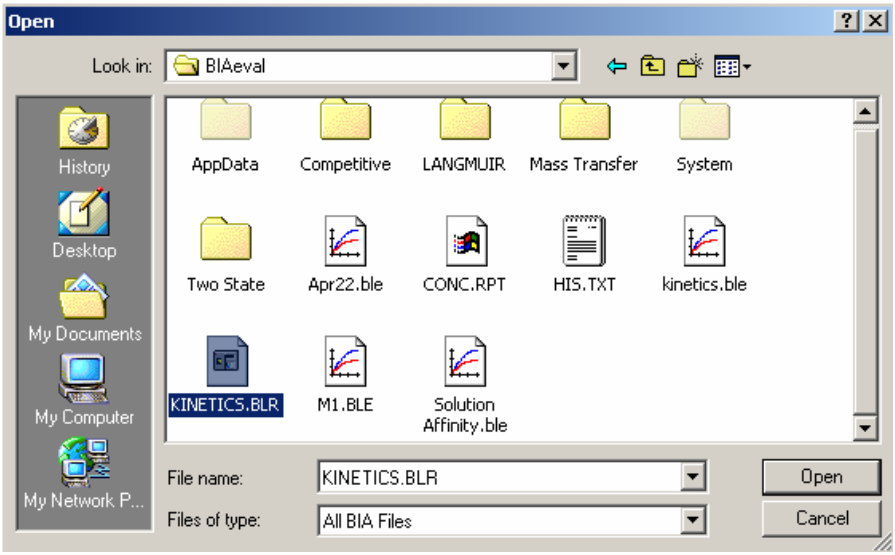
1-1. ソフトウエアの起動

画面左下の **Start** → **BIAprogram** → **BIAevaluation** をクリックする。



1-2. ファイルの呼び出し

アイコン（ ）をクリックし、目的のファイルを選択する。
ここでは、練習用データ C:/Program Files/BIAeval/KINETICS.BLR を選択する。



Open をクリックする。

ファイルの種類とアイコン

ファイルの種類によってアイコンが異なる。

(1) Biacore コントロールソフトウエアで保存したファイル

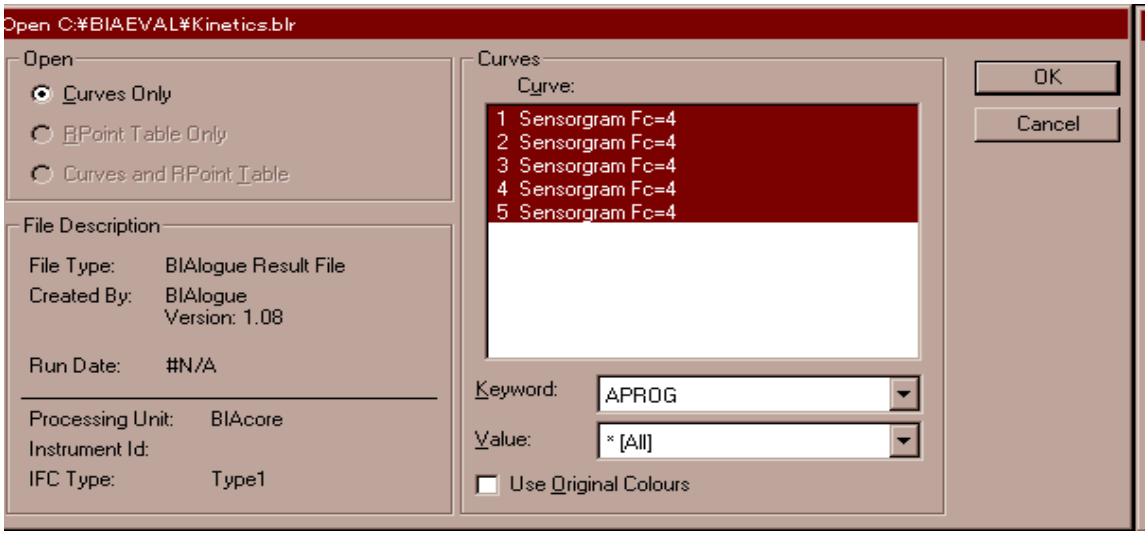
Kinetics.blr

(2) BIAevaluation ソフトウエアで保存したファイル

kinetics.ble

(3) テキスト形式で保存したデータファイル

His.txt



Use Original Colors

Use Original Colors をチェックすると、各フローセルが Biacore コントロールソフトウエアと同様のオリジナル色で表示される。

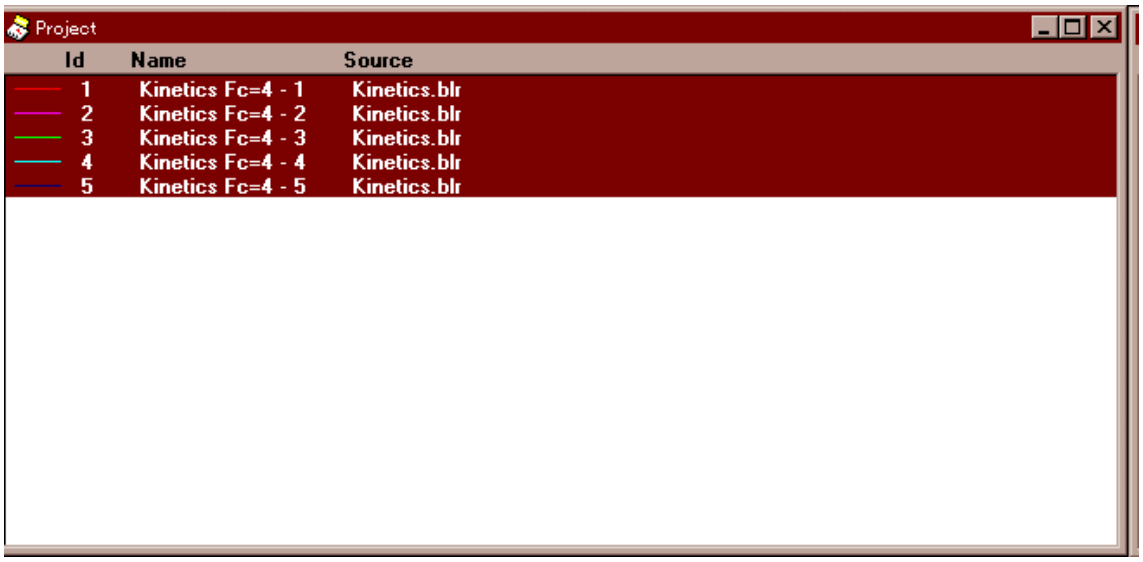
(Biacore3000,2000,1000)	(Biacore X)
フローセル 1 ・・・・・・赤	フローセル 1 ・・・・・・赤
フローセル 2 ・・・・・・緑	フローセル 2 ・・・・・・緑
フローセル 3 ・・・・・・青	フローセル 1-2 ・・・・・・黒
フローセル 4 ・・・・・・ピンク	フローセル 2-1 ・・・・・・黒

Use Original Colors は、必要に応じて使用する。

OK をクリックする。

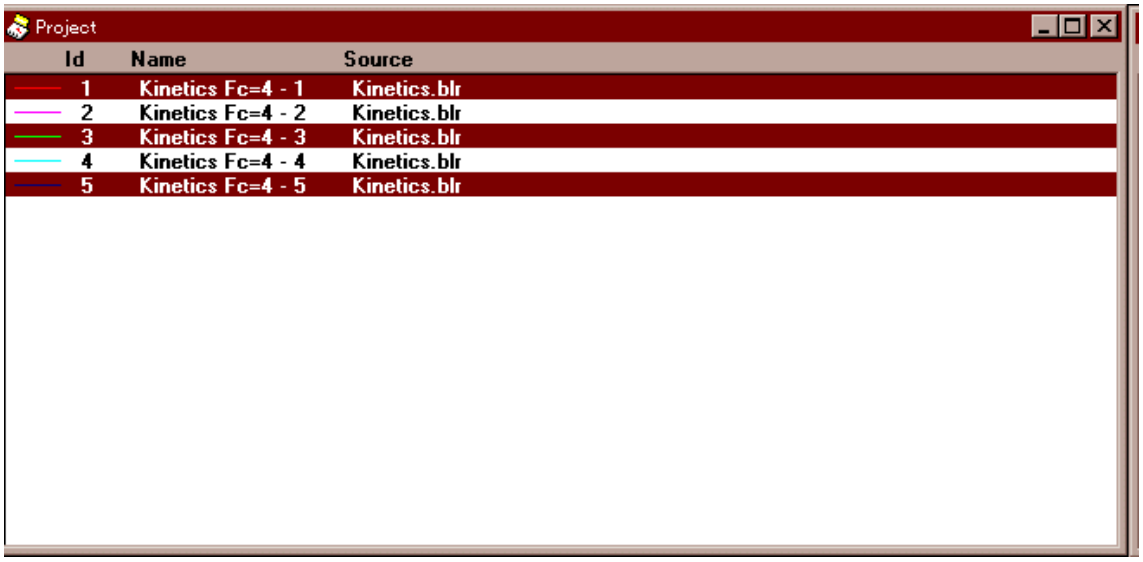
1-3. グラフ化

OK をクリックした状態では全カーブが選択されている。

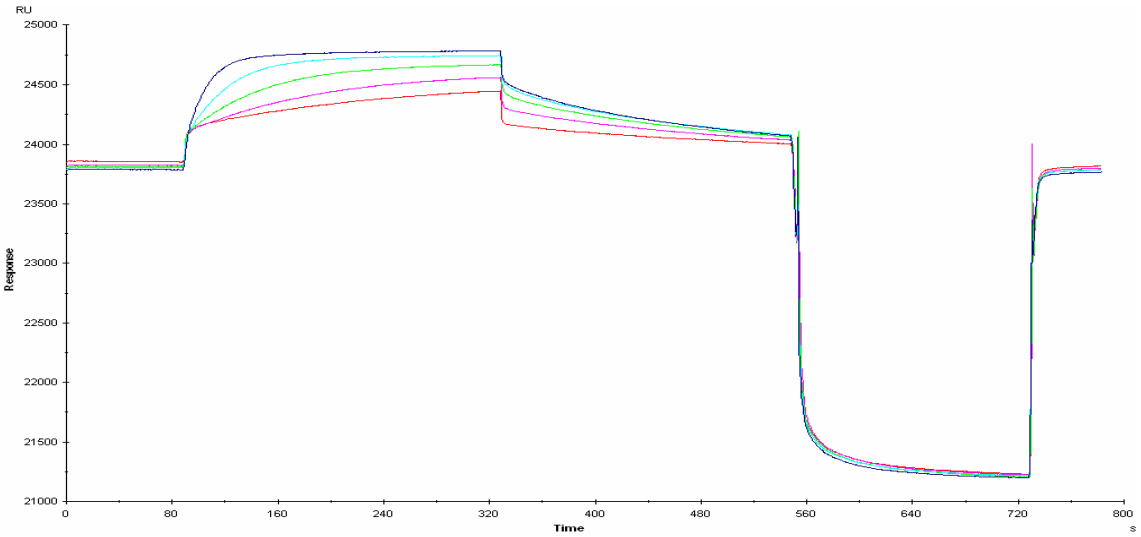


目的のカーブのみをグラフ化したい場合には、カーソルを目的のカーブに移動後、クリックする。不連続なカーブを選択したい場合には、コントロール・キー（Ctrl）を押しながらクリックする。連続したカーブを選択したい場合には、マウスのドラッグ操作で選択できる。また、一番上のカーブを選択し、シフト・キー（Shift）を押しながら、最後のカーブをクリックすると、全カーブが選択される。

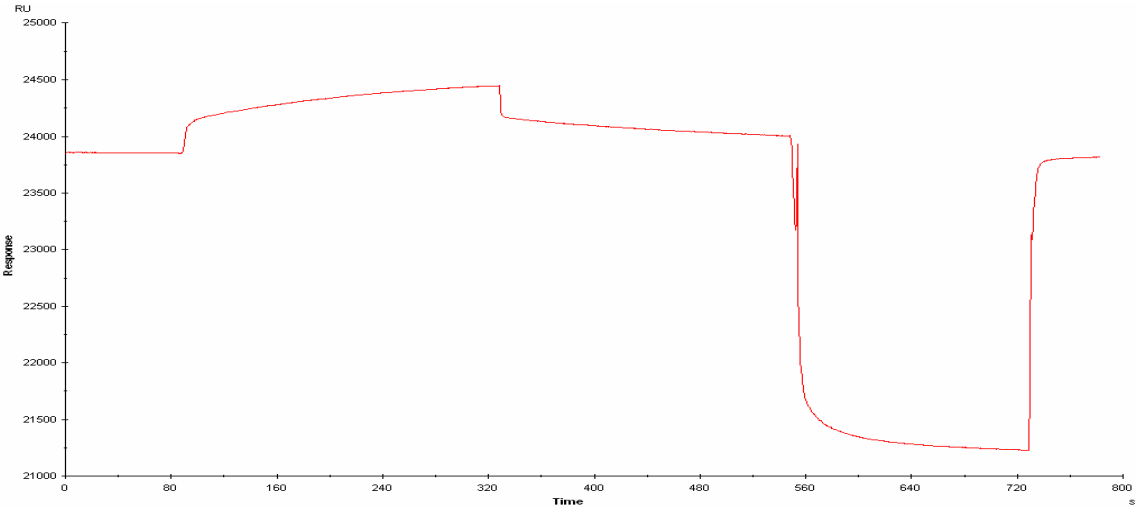
（例）



グラフ化したいカーブを選択後、アイコン（ ）をクリックする。



再度、アイコン（ ）をクリックすると、画面右上のカーブリストに表示されているカーブのみが、１本表示される。



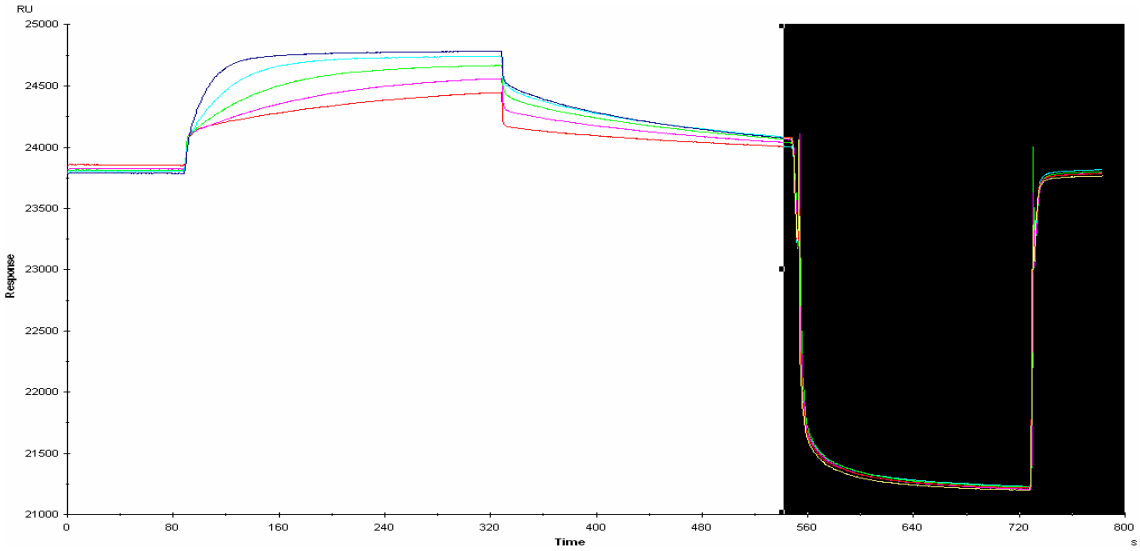
カーブリスト Curve

の で選択しているカーブを切り替えると、表示グラフを変更できる。

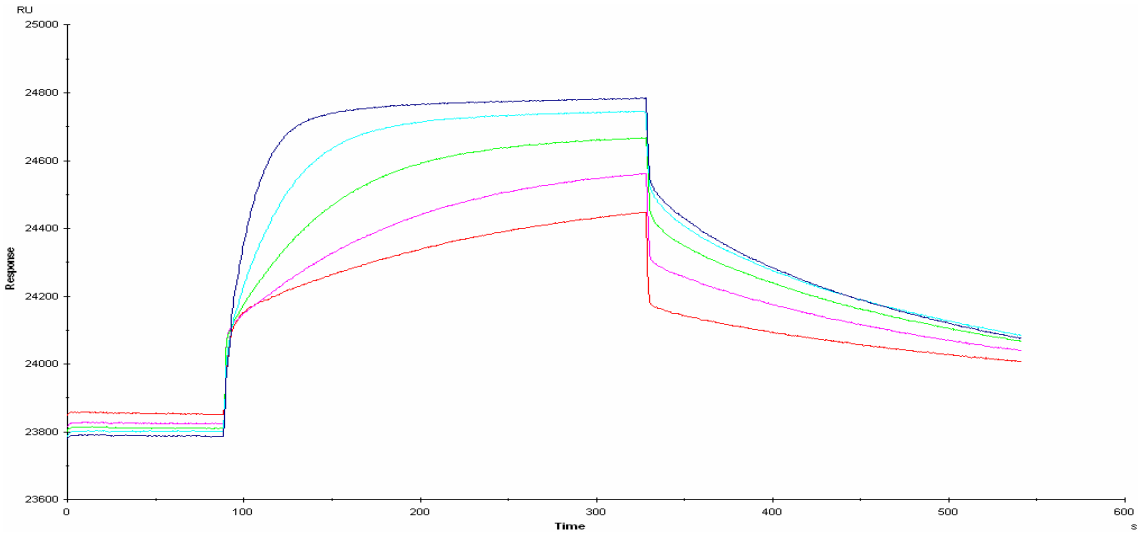
1-4. センサーグラムの編集

1-4-1. 不必要部分の削除

センサーグラム中の不必要な部分（再生領域など）を削除する。削除する範囲をマウスの右のボタンをドラッグし選択する。

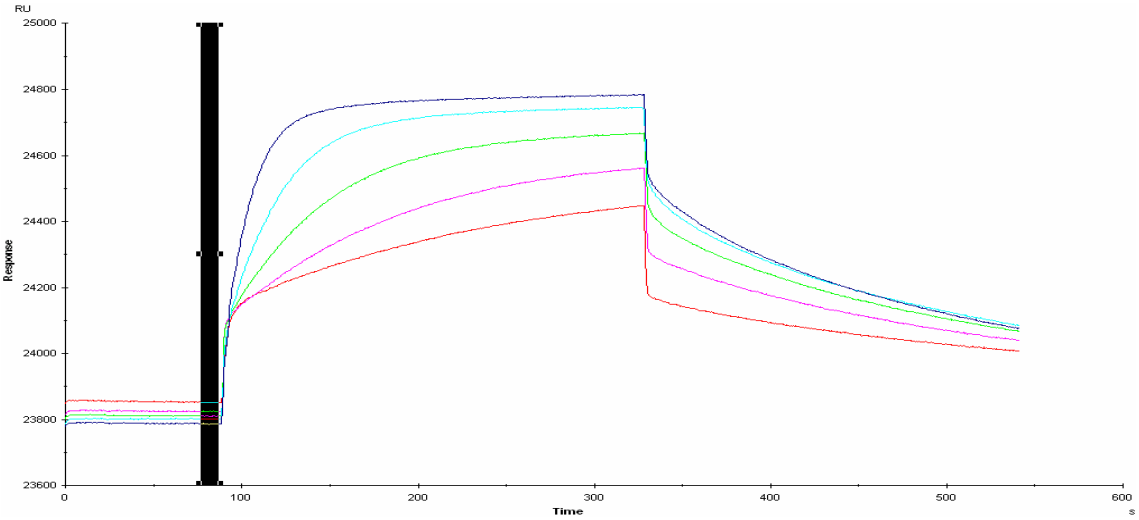


Edit → Cut をクリックする（キーボードのコントロール・キーを押しながらXキーを押しても削除できる）。

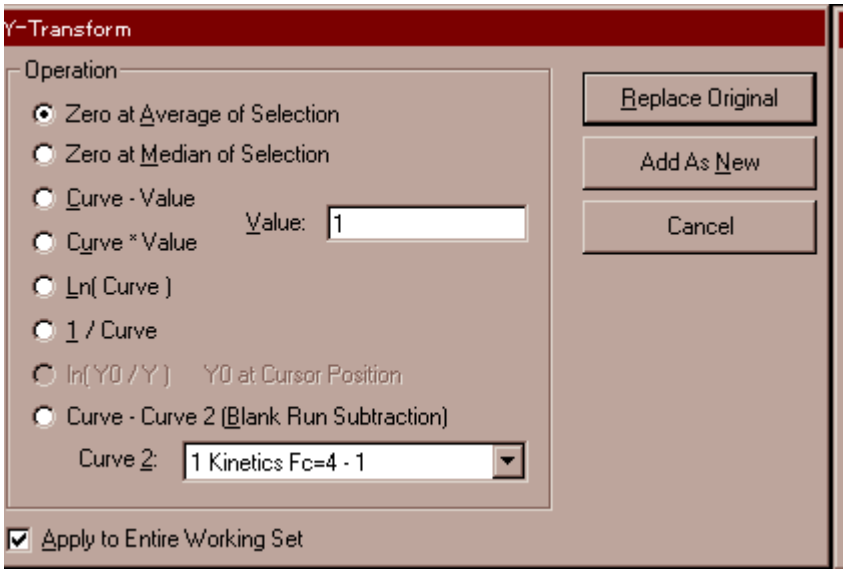


1-4-2. ベースライン(Y 軸)のあわせ方

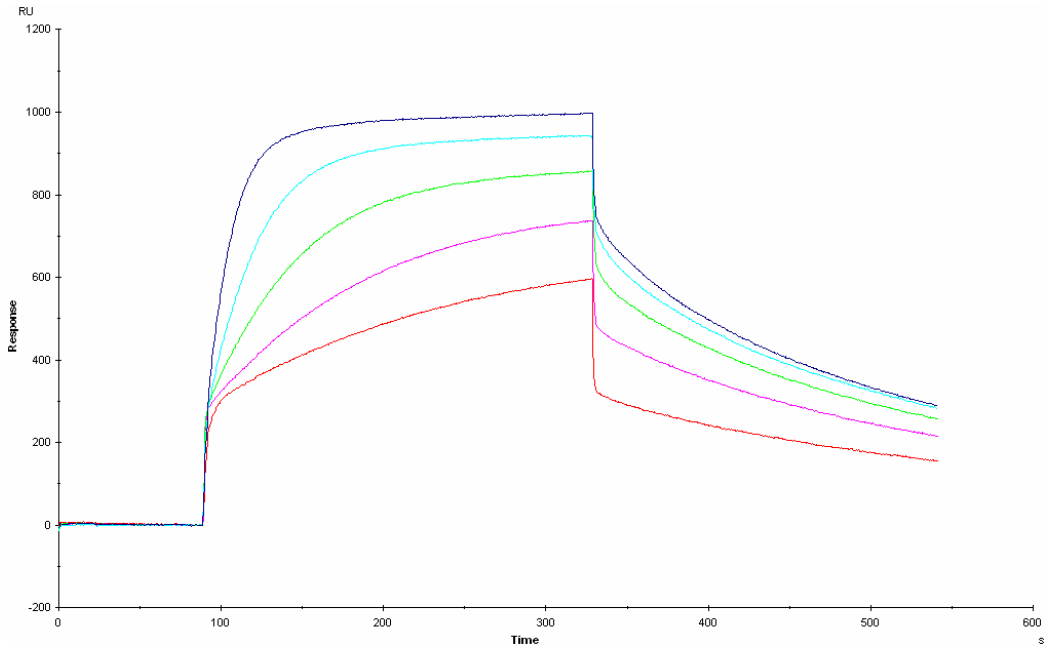
マウスの右ボタンを使用し、ベースラインをあわせる範囲（添加開始ポイントより少し手前の 10～20 秒間程度）をドラッグし、選択する。



アイコン（ ）あるいは **Calculate → Y -Transform...**をクリックする。

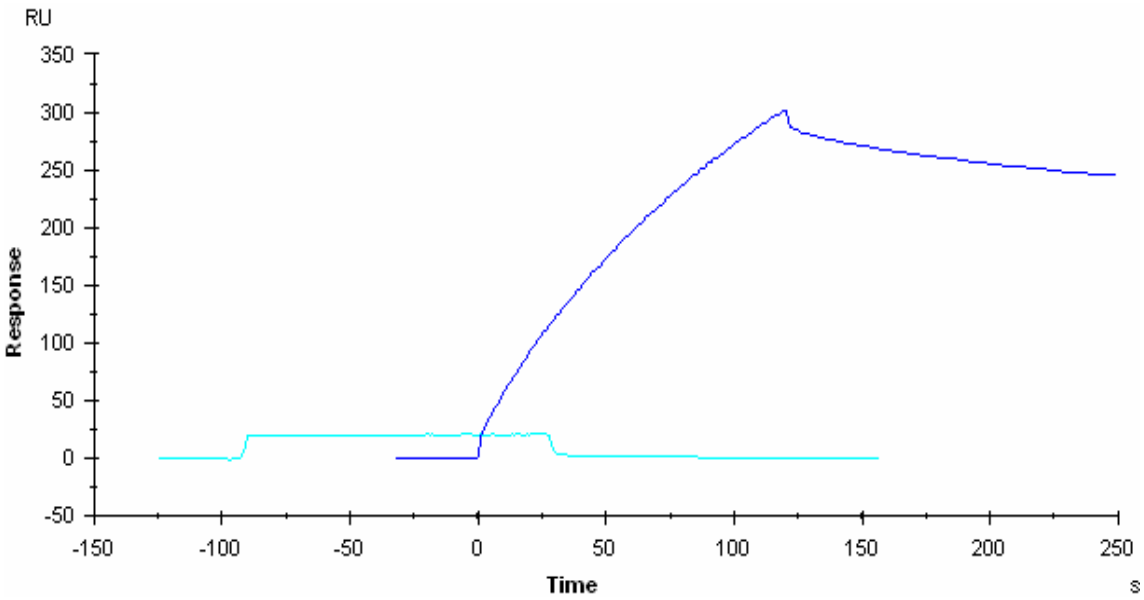


一番上の ○ **Zero at Average of Selection** を選択し、Replace Original をクリックする。



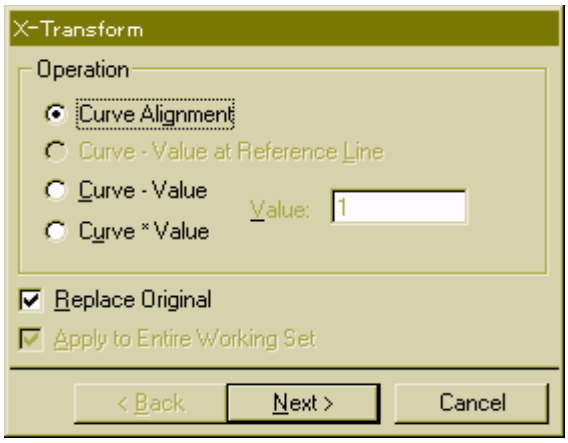
1-4-3. 添加開始ポイント(X 軸)のあわせ方

異なったプログラムで作成したセンサーグラムやマニュアル操作で測定したセンサーグラムを重ね書きする場合、添加開始ポイントの位置が異なることがある。

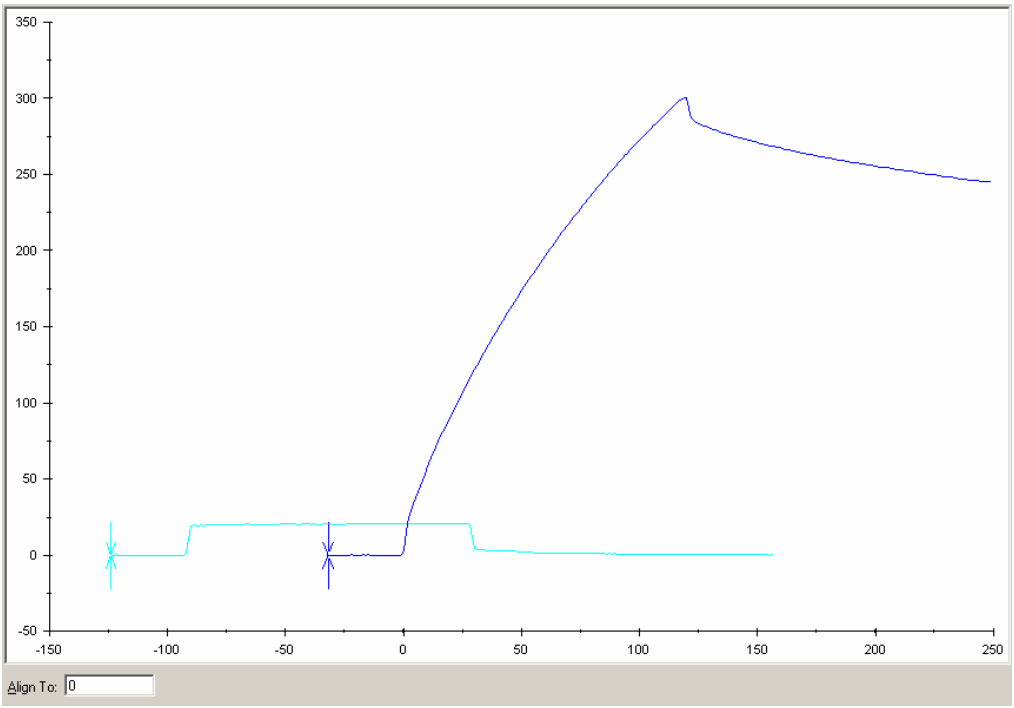


添加開始ポイントを合わせるため、センサーグラムを X 軸方向に移動させる。

アイコン（ ）あるいは **Calculate → X -Transform...**をクリックする。

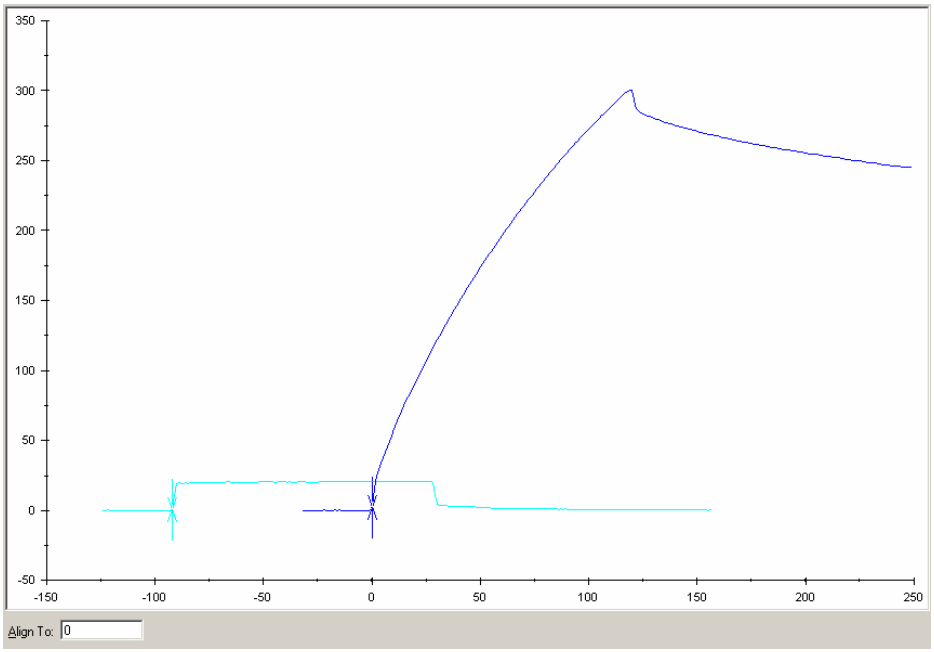


一番上の **Curve Alignment** を選択し、**Next >**をクリックする。

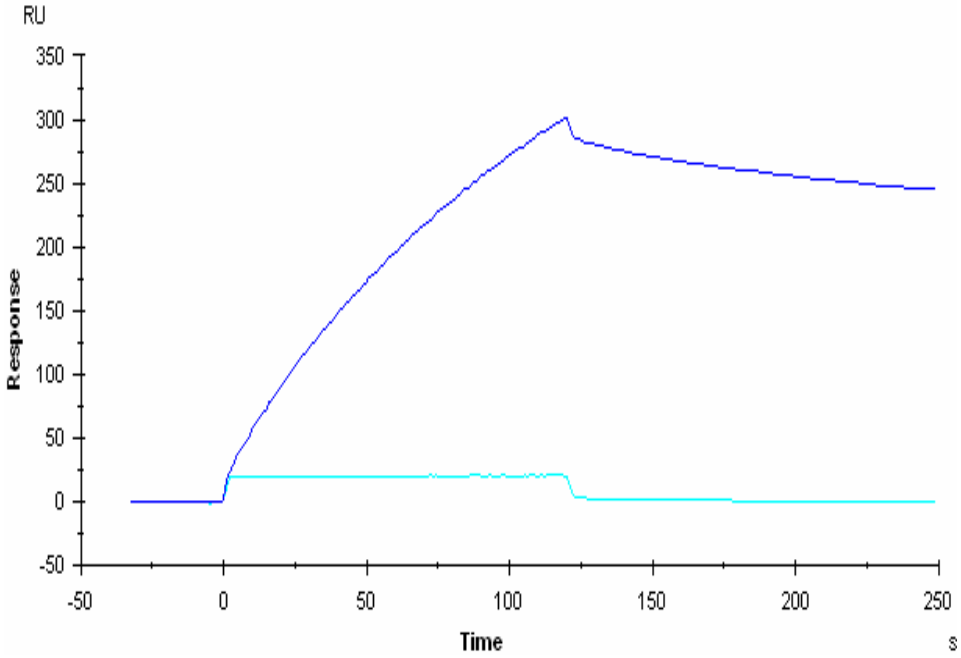


センサーグラム上に、各センサーグラムと同色のバーが表示される。
バーを各センサーグラム上の添加開始ポイントにそれぞれ移動する。

正確に添加開始ポイントを合わせたい場合は、添加開始ポイント付近をマウスのドラッグ操作で拡大する。



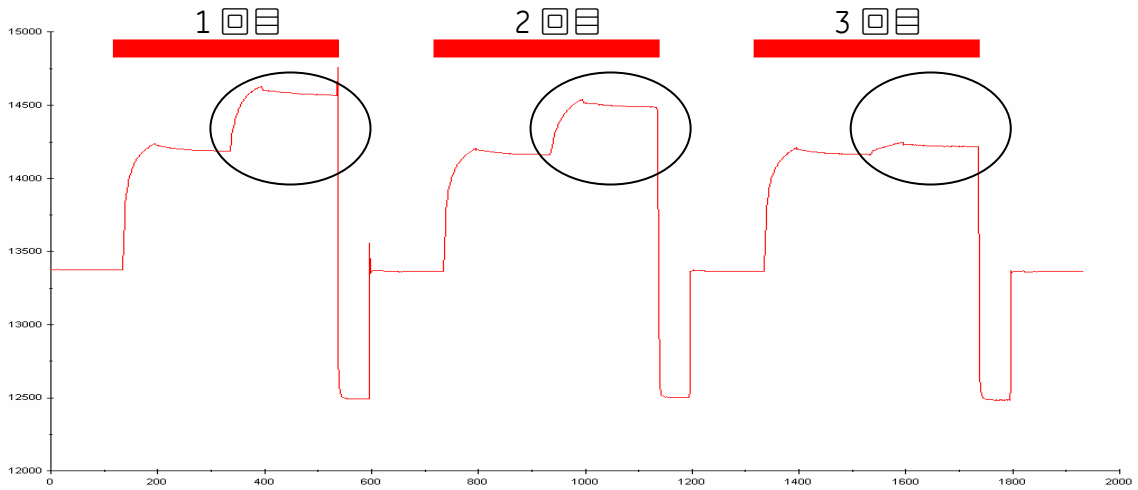
すべてのセンサーグラムについて設定後、**Finish** をクリックする。



X 軸方向の位置が一致する。

1-4-4. 一本のセンサーグラムからの重ね書き

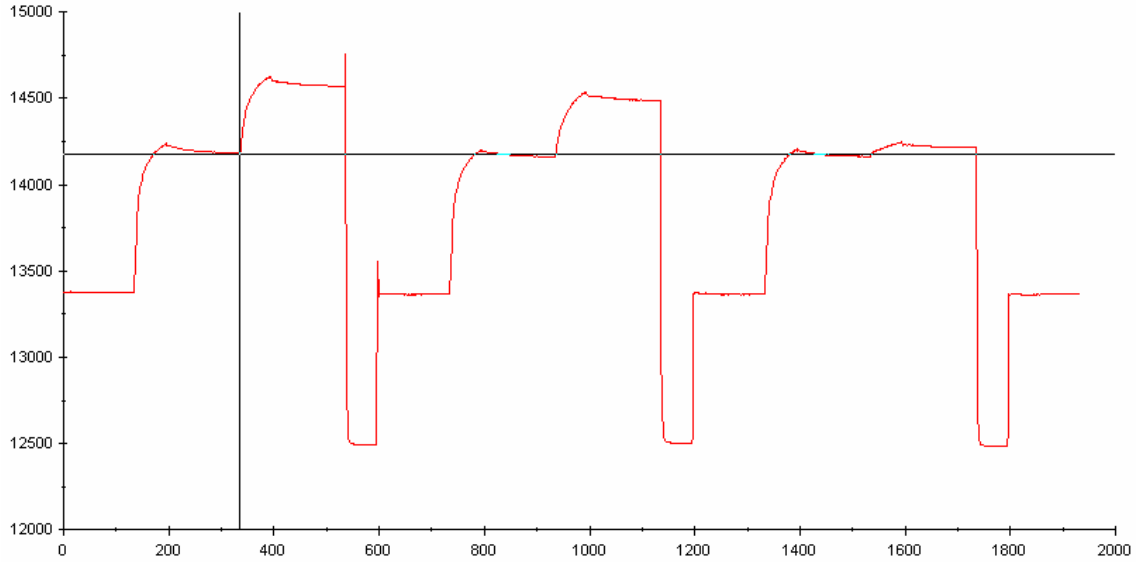
複数のサンプルについて、測定サイクルを変えず、一連のセンサーグラムの中で繰り返し実験を行った場合には、下記のようなデータが得られる。
ここでは、練習用データ C:/Program files/Biaeval/ His を使用する。



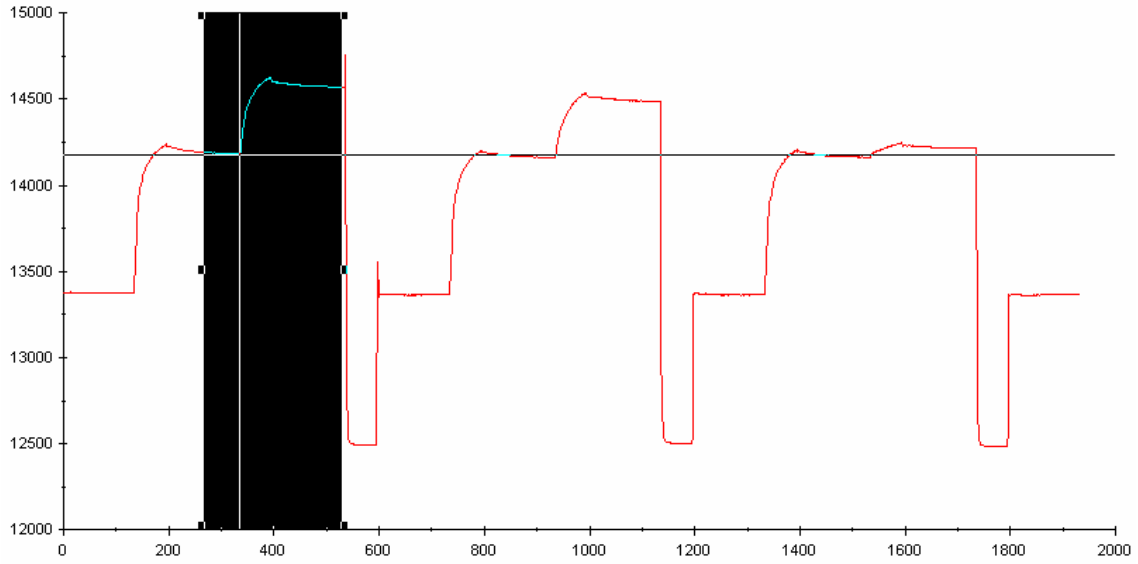
この実験は、リガンドをキャプチャー法にてセンサーチップ表面にトラップさせ、相互作用測定を行う実験で得られるセンサーグラムの一例である。溶液の添加は、リガンド→アナライト→再生溶液の順で、その一連の実験について、アナライト濃度を変え、連続して測定したものである。

３つの重ね書きしたい部分をコピー・ペーストして３枚のセンサーグラムに分けて、重ね書きをする。

１つ目の部分をコピー・ペーストする。リファレンスライン（ ）を呼び出し、添加開始ポイントにあわせる。

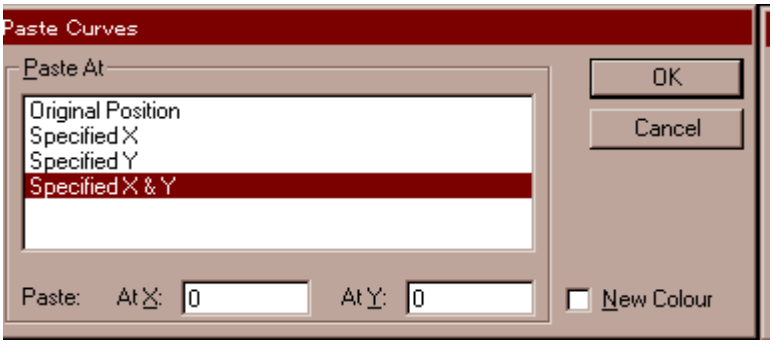


コピーしたい範囲をマウス右ボタンでドラッグする。

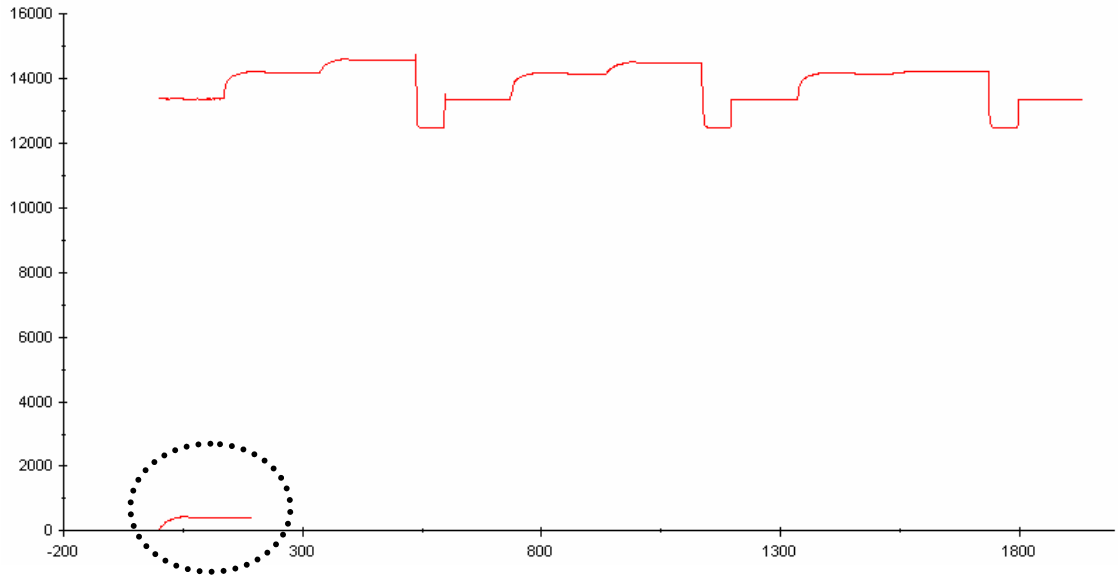


Edit → **Copy**（注：Copy　Graph ではない）をクリックする。

Edit → **Paste Curve** をクリックする。



Specified　X & Y を選択し、**OK** をクリックする。



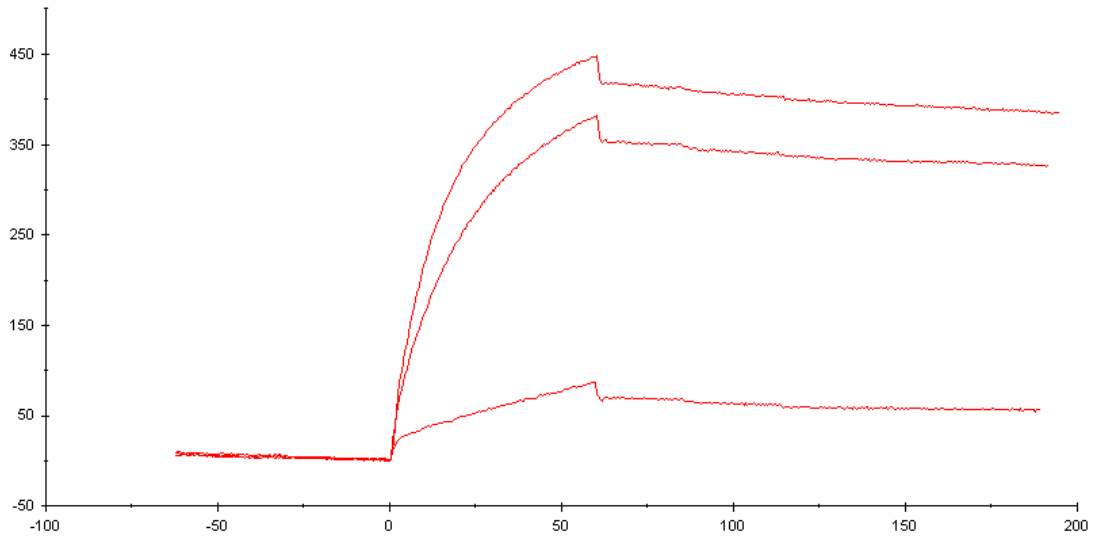
選択された範囲がペーストされる。ペーストしたセンサーグラムは自動保存される。

File → **Close** をクリックする。

プロジェクト（**Window** → **Project**）画面に戻ると、ペーストしたセンサーグラムが追加されている。

もう一度（—— **1** **his.txt 1** **HIS.TXT**）を選択し、 をクリックして最初の連続したセンサーグラムを表示させた後、２個目、３個目のセンサーグラムに関しても同様にコピー・ペーストしていく。

ペーストした３本のカーブを選択し、重ね書きをする。さらに、必要があれば、不要な部分を削除し、ベースラインをあわせる。

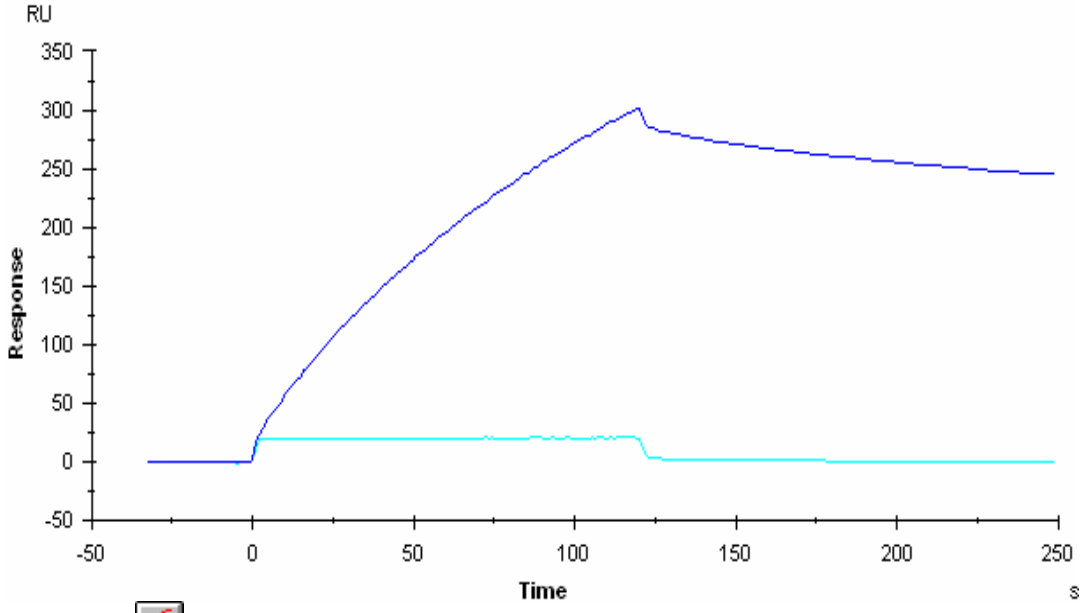


1-4-5. センサーグラムの引き算

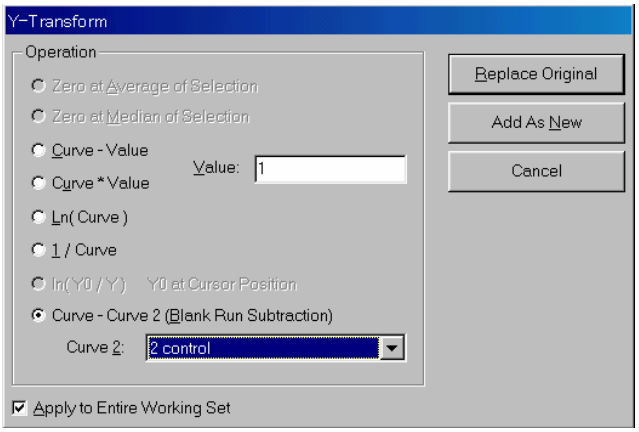
リファレンスの自動差し引き機能を使用せず実験を行った場合には、リガンド固定化セルで得られたセンサーグラムからリファレンスセルを差し引きする必要がある。

引き算をするセンサーグラムは、予め添加開始ポイントを揃えておく。

結合のセンサーグラム（—— 1 sample 1 ）からコントロールのセンサーグラム（—— 2 control ）を引き算する場合、まず、１，２のカーブを重ね書きする。

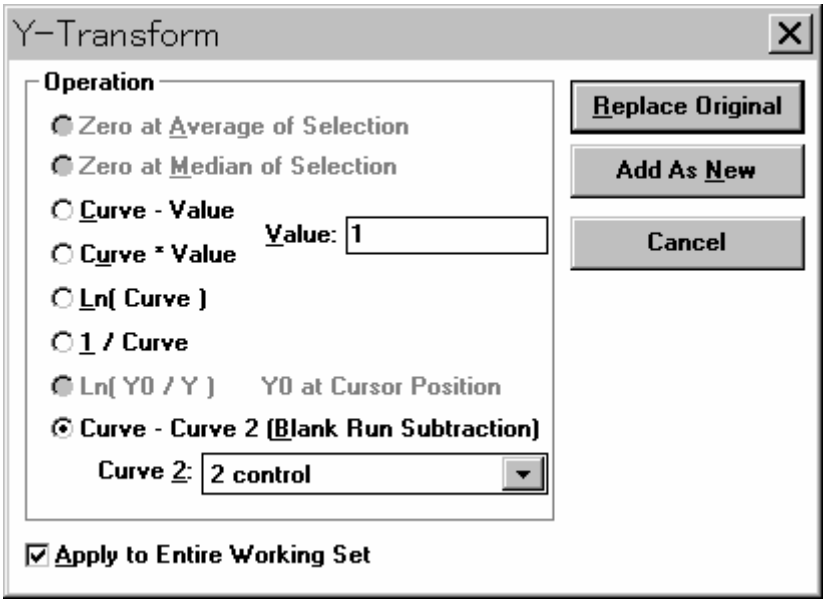


アイコン（ ）をクリックする。

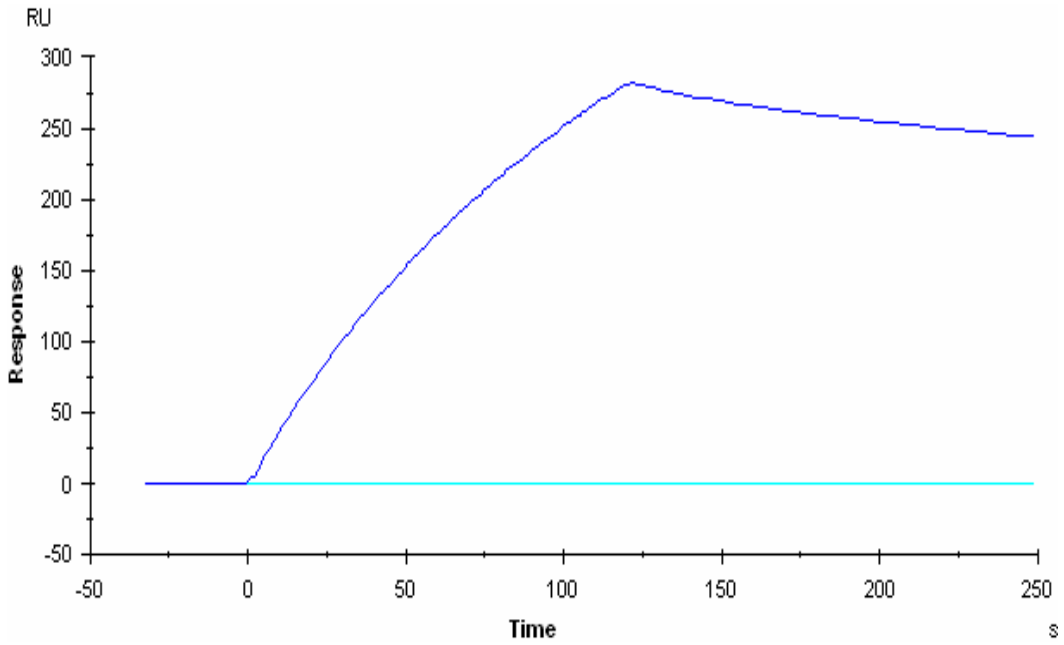


○ **Curve - Curve 2 (Blank Run Subtraction)**を選択し、**Curve 2**：の▼をクリックして、引くカーブを選択する（この場合は-2 control）。

↓



Replace Original（表示しているグラフに上書き）あるいは **Add As New**（新しいグラフを作成）をクリックする。



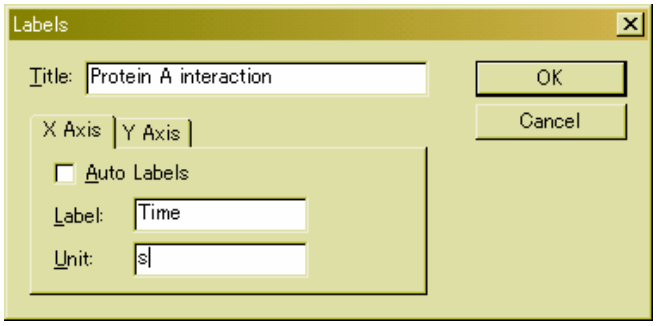
引き算されたセンサーグラムが表示される。

1-5. その他

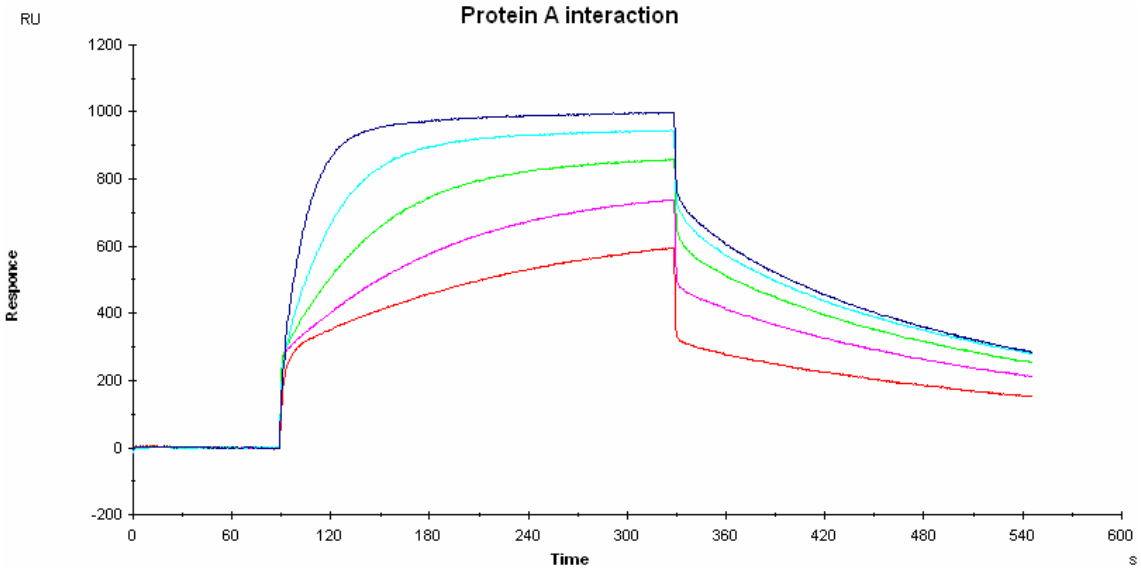
1-5-1. グラフのタイトル

View → Labels

をクリックする。任意のタイトルを入力し、**OK** をクリックする。



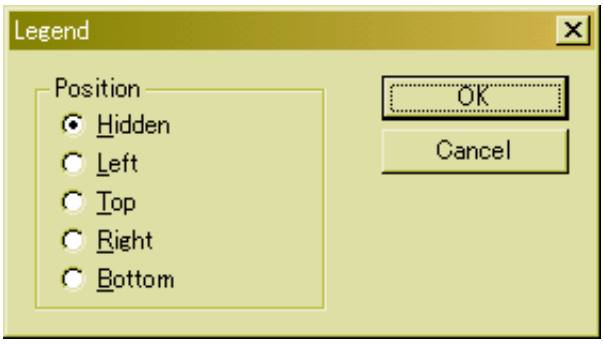
グラフ中の X 軸,Y 軸の表示を変更する場合も、この Labels ボックス中で操作できる。☐ **Auto Labels** のチェックを外し、必要事項を入力する。



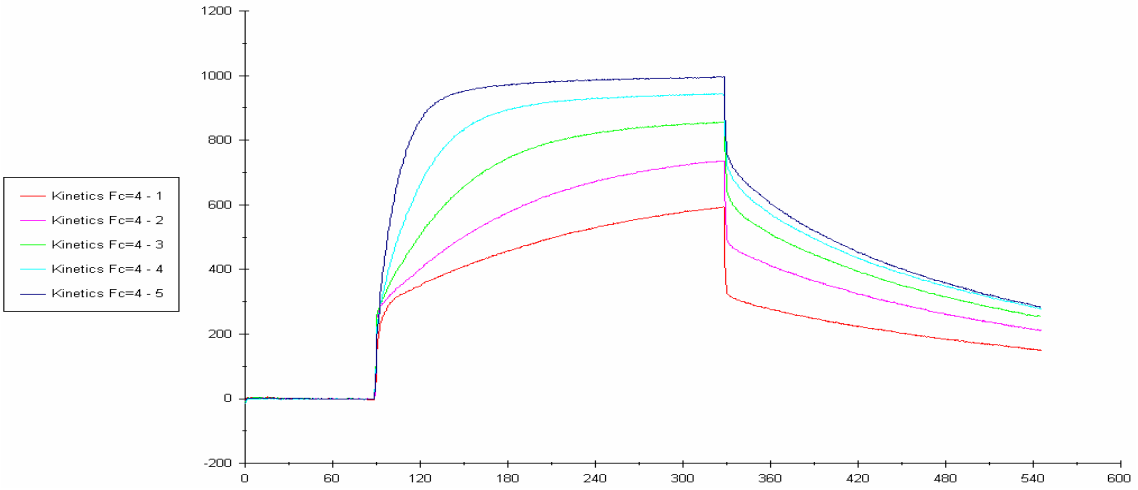
1-5-2. センサーグラムの凡例

View → Legend

をクリックする。凡例表の表示位置を選択し、**OK** をクリックする。

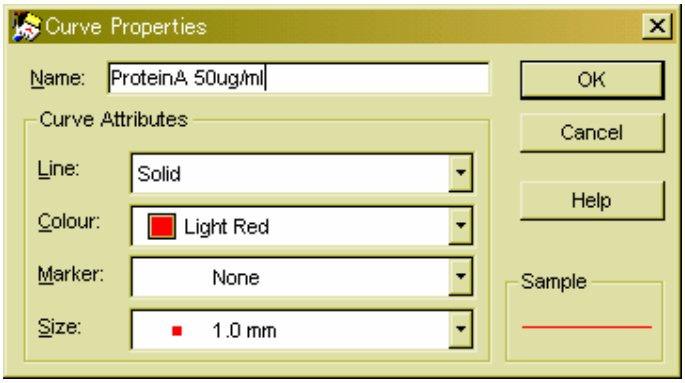


Hidden	凡例を表示しない
Left	グラフの左に表示
Top	グラフの上に表示
Right	グラフの右に表示
Bottom	グラフの下に表示

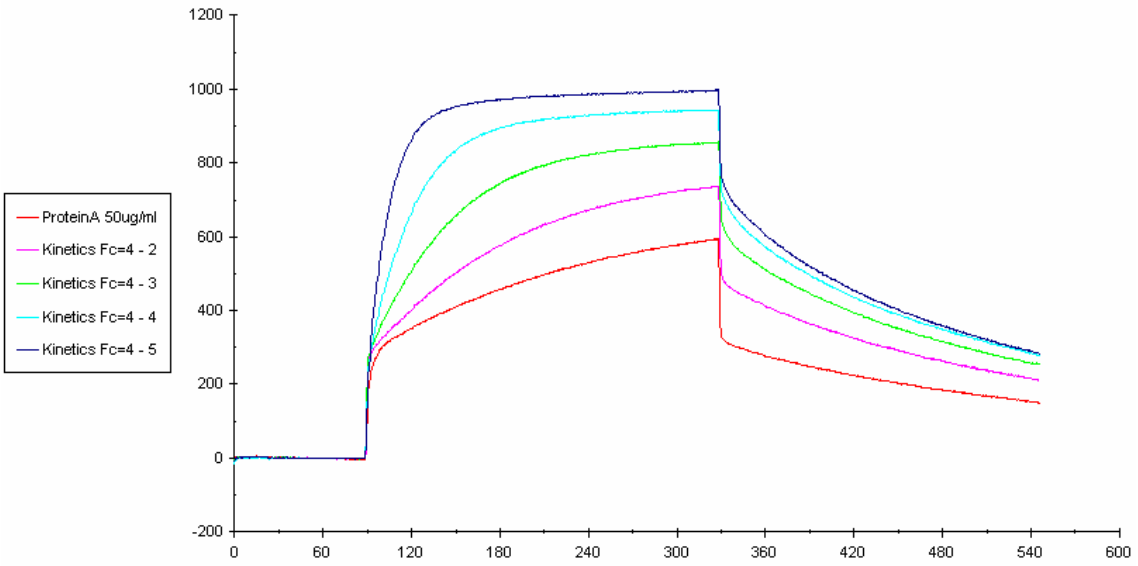


ここで表示されるのはプロジェクト画面で入力されているセンサーグラムの Name が表示される。

凡例の表示内容を変更したい場合は、変更したいセンサーグラムをダブルクリックする。



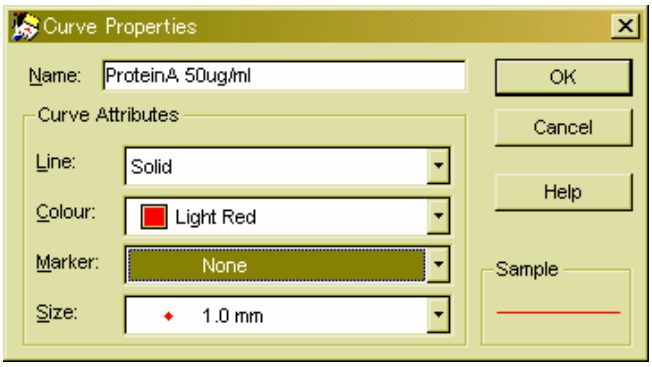
Name:　中に凡例として表示したい内容を記載し、**OK** をクリックする。



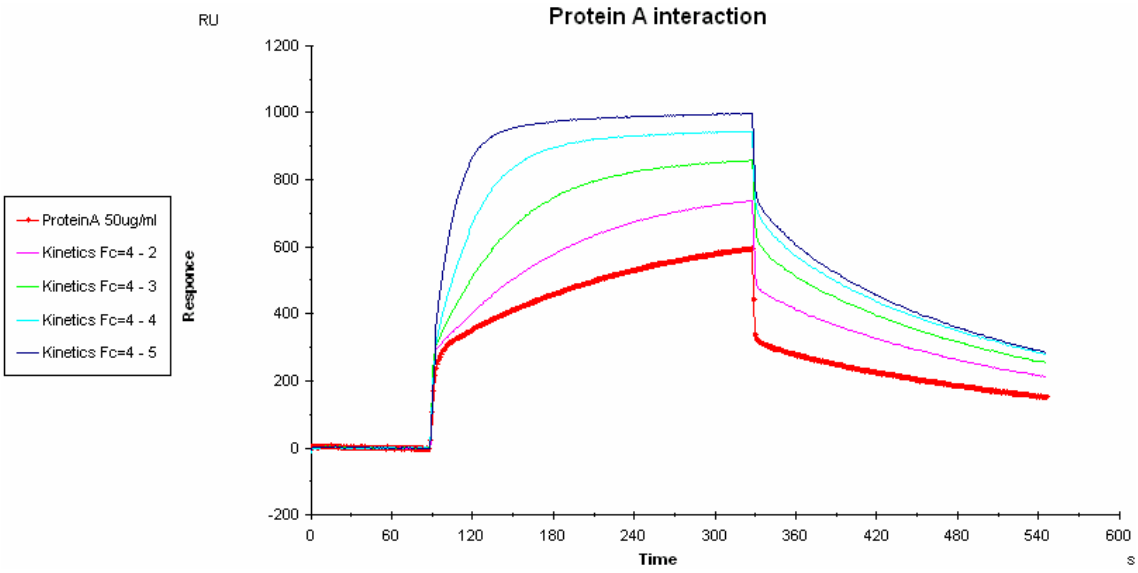
1-5-3. センサーグラムの色,その他表示の変更

センサーグラムをダブルクリックし、**Curve Properties** を表示させる。 **Color:**

の▼をクリックし、色を変更し、**OK** をクリックする。
その他、センサーグラムの名前、マーカーの有無、サイズもここで変更できる。



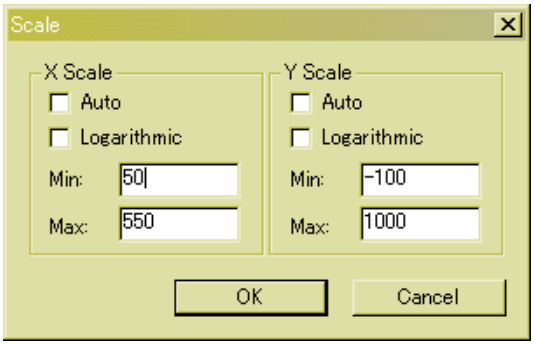
(マーカーの変更例)

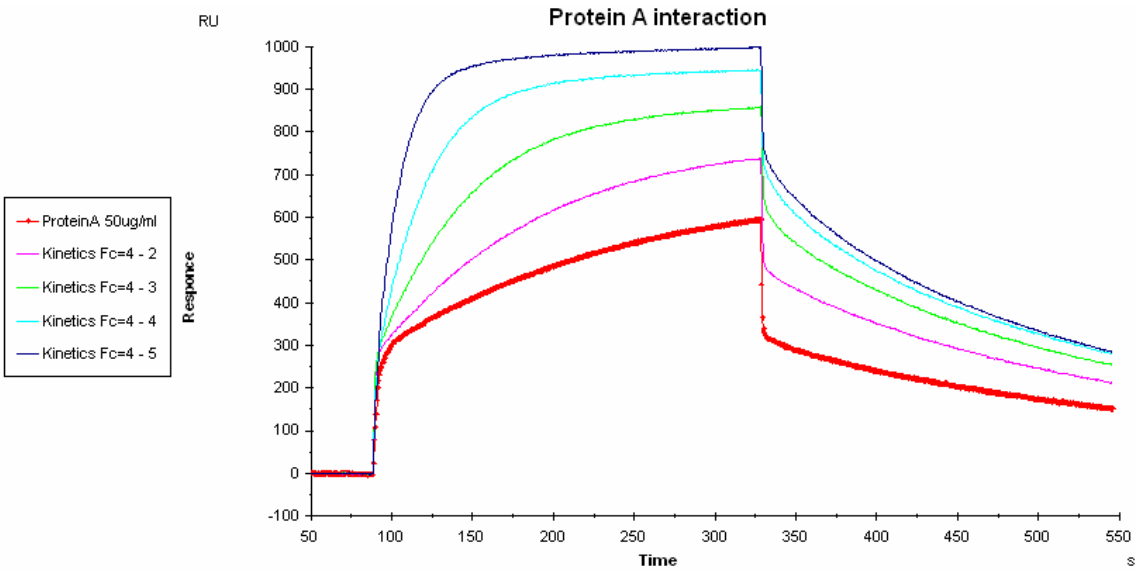


1-5-4. グラフのスケール

View → Scale

をクリックする。☐ **Auto** 中のチェックを外し、X 軸,Y 軸のスケールを入力し、**OK** をクリックする。





2. センサーグラムからの反応速度定数の算出（Kinetics 解析）

2-1. 解説

2-1-1. 結合定数、解離定数と、反応速度定数

分子同士が相互作用する時には、両者には何らかの Affinity があることを意味する。Affinity は、結合の強さを表す尺度として一般的に使用されており、結合定数（K_A、単位 M^{-1}）あるいは解離定数（K_D、単位 M）として、記述される。例えば、A+B ⇔ AB 反応の平衡状態において、解離定数(K_D)は、K_D = ［A］［B］/［AB］と定義される（結合定数 K_A=1/ K_D）。この数値が低いほど Affinity は強いことになる。しかし、この Affinity の大小と、反応が平衡に至るまでの速度は全く別の問題である。Affinity の大小は、結合の速さおよび解離の速さによって決定される。つまり、速い結合および遅い解離の結合ほど Affinity は強くなり、遅い結合および速い解離の結合ほど Affinity は弱くなる。

反応速度に関するパラメータ（kinetics parameter）は、結合速度定数（k_a、単位 $M^{-1}s^{-1}$）解離速度定数（k_d、単位 s^{-1}）として表現される。

$$A + B \underset{k_d}{\overset{k_a}{\rightleftharpoons}} AB$$

$K_D = k_d / k_a$　　$K_A = k_a / k_d$

この章では、反応速度定数の解析 つまり Kinetics parameter（結合速度定数 k_a、解離速度定数 k_d）の解析について説明する。

2-1-2. BIAevaluation による解析法

Biacore での反応速度論的解析では、得られたセンサーグラムから直線性のある変換式に変換し、線形最小二乗法により解析する線形解析（Linear fitting）法とセンサーグラムを非線形最小二乗法により直接カーブフィッティングさせ、解析する非線形解析（Non linear fitting）法がある。BIAevaluation では、上記の線形解析および非線形解析の両方を用いて解析が可能である。

以下に、Kinetics 解析法を一覧表にまとめる。

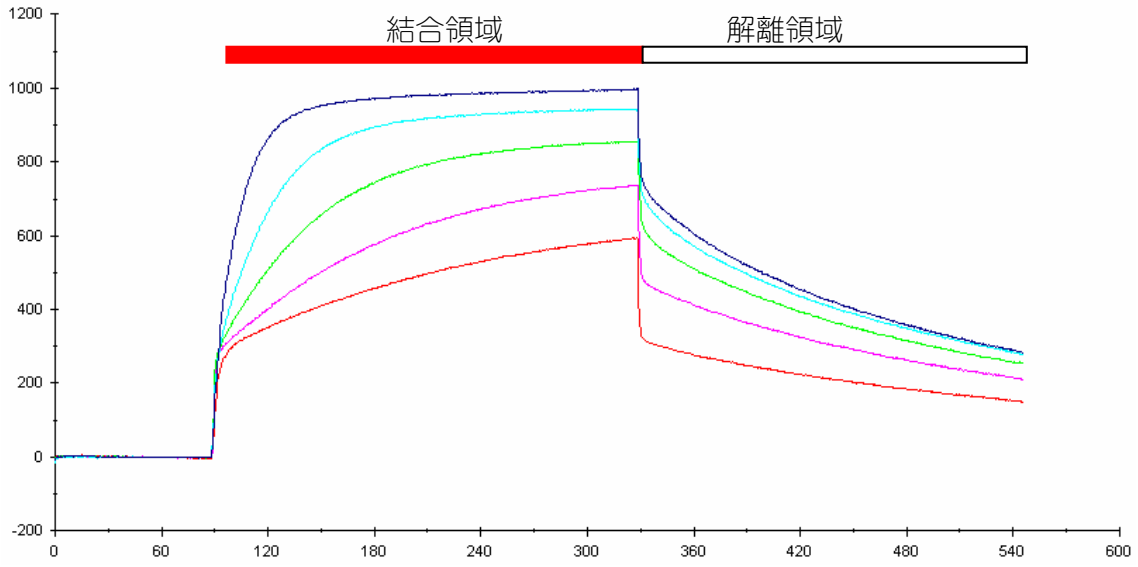
Kinetics 解析

- 非線形解析（2-1.）
  - 同時解析（2-1-2.）（Simultaneous fitting）
    - Global fitting（2-1-1）
    - Local fitting（2-1-2）
  - 分割解析（2-1-3.）（Separate fitting）
- 線形解析（2-2.）

非線形解析法は、結合領域と解離領域のグラフに対し、同時にカーブフィッティングする同時解析（Simultaneous fitting）と各相におけるグラフで別々にカーブフィッティングする分割解析（Separate fitting）に分けることができる。

分割解析では、まず、解離領域のセンサーグラムを Curve fitting させることで解離速度定数 k_d を算出し、さらに結合領域のセンサーグラムを用いて Curve fitting し、結合速度定数 k_a を算出する。

一方、同時解析では、センサーグラム全体を Curve fitting させ、結合速度定数 k_a と解離速度定数 k_d を同時に算出する。



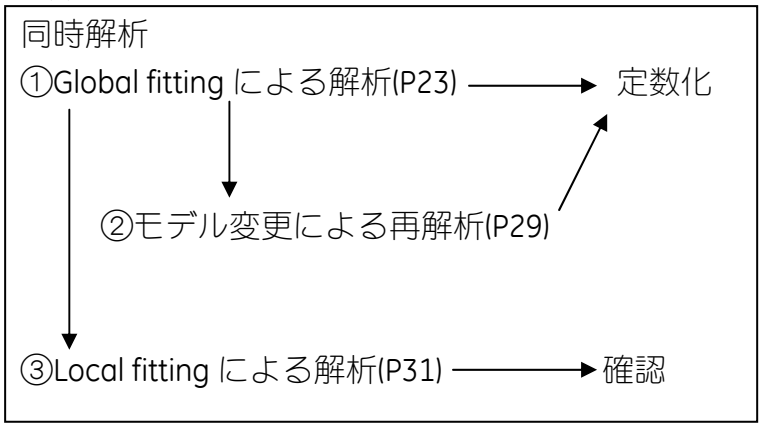
BIAevaluation では同時解析が基本となる。

同時解析はさらに Global fitting と Local fitting の 2 通りに分けられる。
Local fitting では、アナライト一濃度のセンサーグラムに対して一組の kinetics パラメータ（結合速度定数 k_a と解離速度定数 k_d）を算出する。5 段階濃度で測定を行ったセンサーグラムの重ね書きからは、5 個のパラメータが算出される。
一方、Global fitting では、アナライトの全濃度にわたって同時に Curve fitting を行い、全体を通して一組の kinetics パラメータを算出する。Global fitting では、単純な濃度入力ミスやリガンドの失活等がある場合においても、全濃度にわたって共通パラメータとして解析するため、まったく誤った解析結果が得られてしまう可能性があるので注意が必要である。
これらの事から、Global fitting と Local fitting を組み合わせて解析するのがより正しいパラメータを算出する上で重要である。

2-1-3. 解析の手順

BIAevaluation では各種の解析方法が可能であるが、基本的には以下の方法で解析を行うことを推奨する。

(解析の流れ)



(手順)
① Global fitting により、Kinetics パラメータを算出する。
②フィッティングが良好でなく、他に妥当と考えられる反応モデルがある場合は、モデルを変更して再解析を行う。
③妥当と考えられる反応モデルにおいて、良好にフィッティングしない場合は、濃度の入力ミスや実験上の問題が原因と考えられる。各種解析モードを Local 設定し、再解析する。

以上の流れで解析を行う。

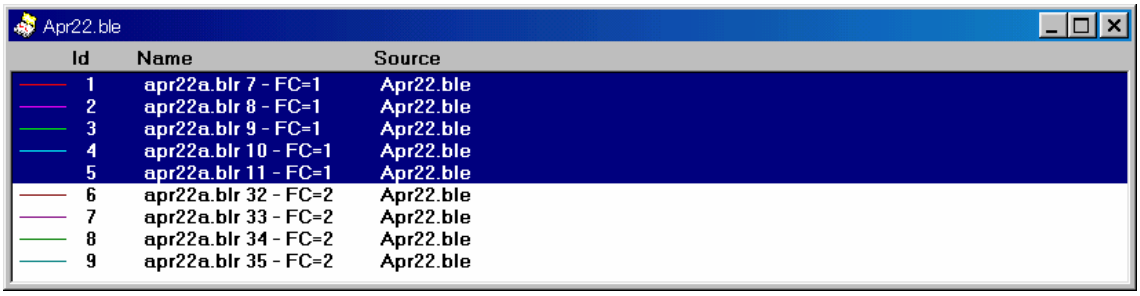
2-2. 非線形解析

2-2-1. 同時解析－Global fitting による解析

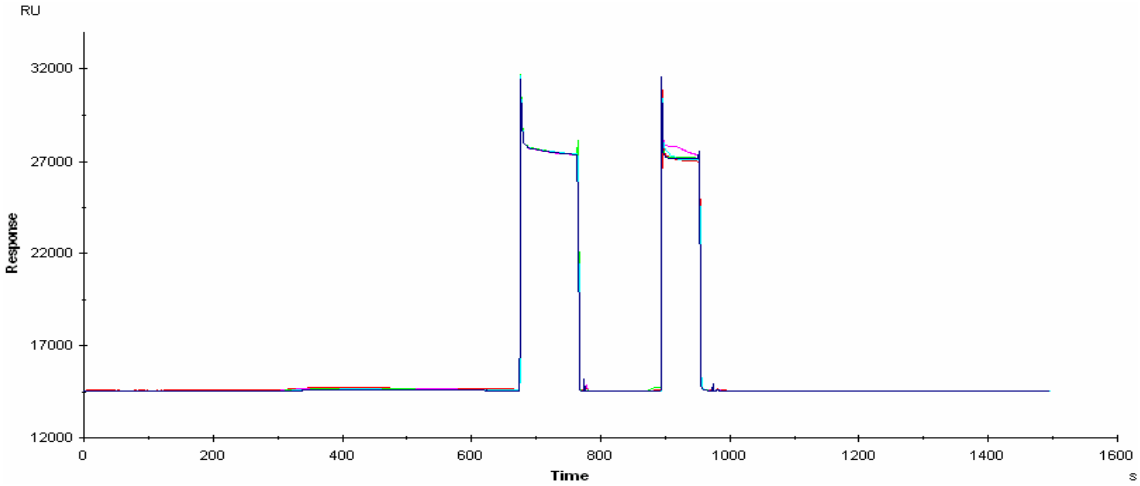
①グラフの重ね書き（1 章参照）

ここでは、C:/Program Files/BIAeval/Apr22 ファイルを使用して説明する。

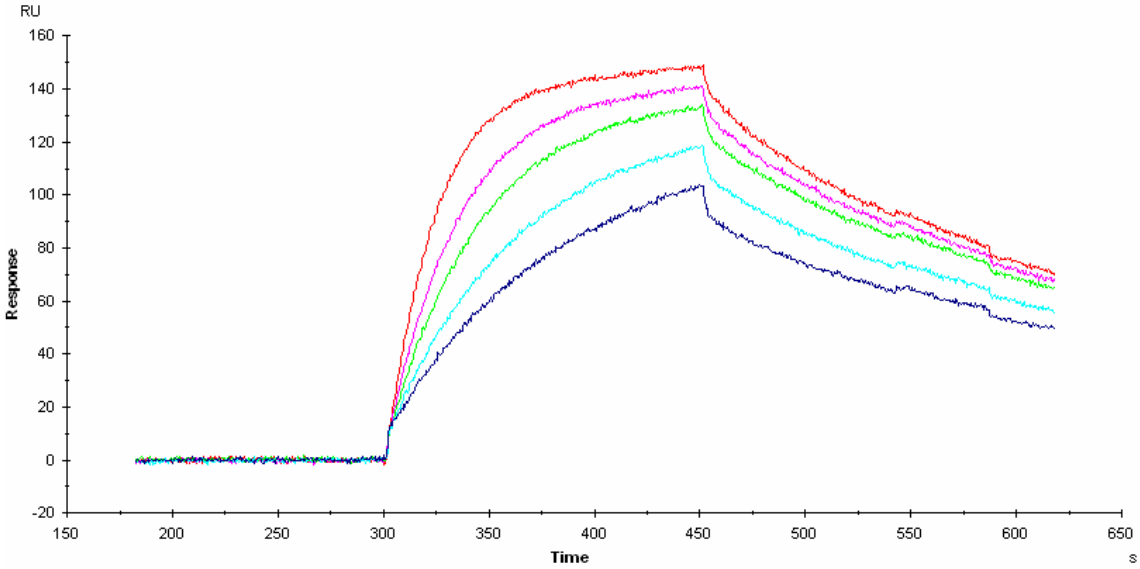
ファイルを呼び出す。



上から 5 個を選択し、重ね書きする。



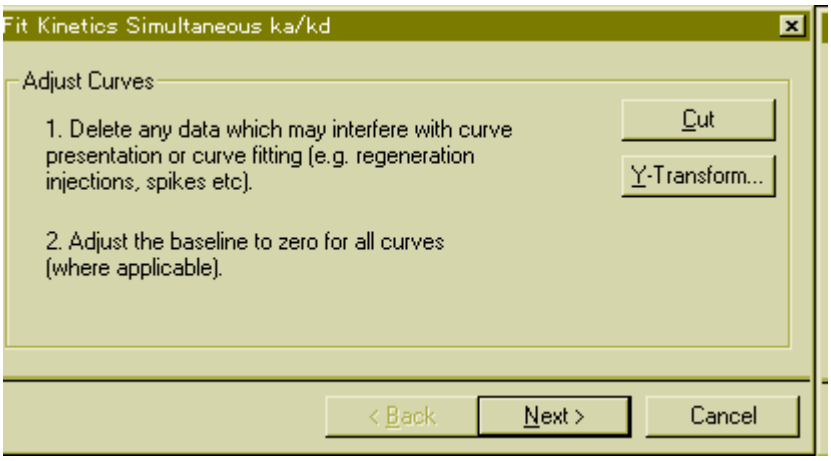
再生部分を削除し、ベースラインを **0** に合わせる。



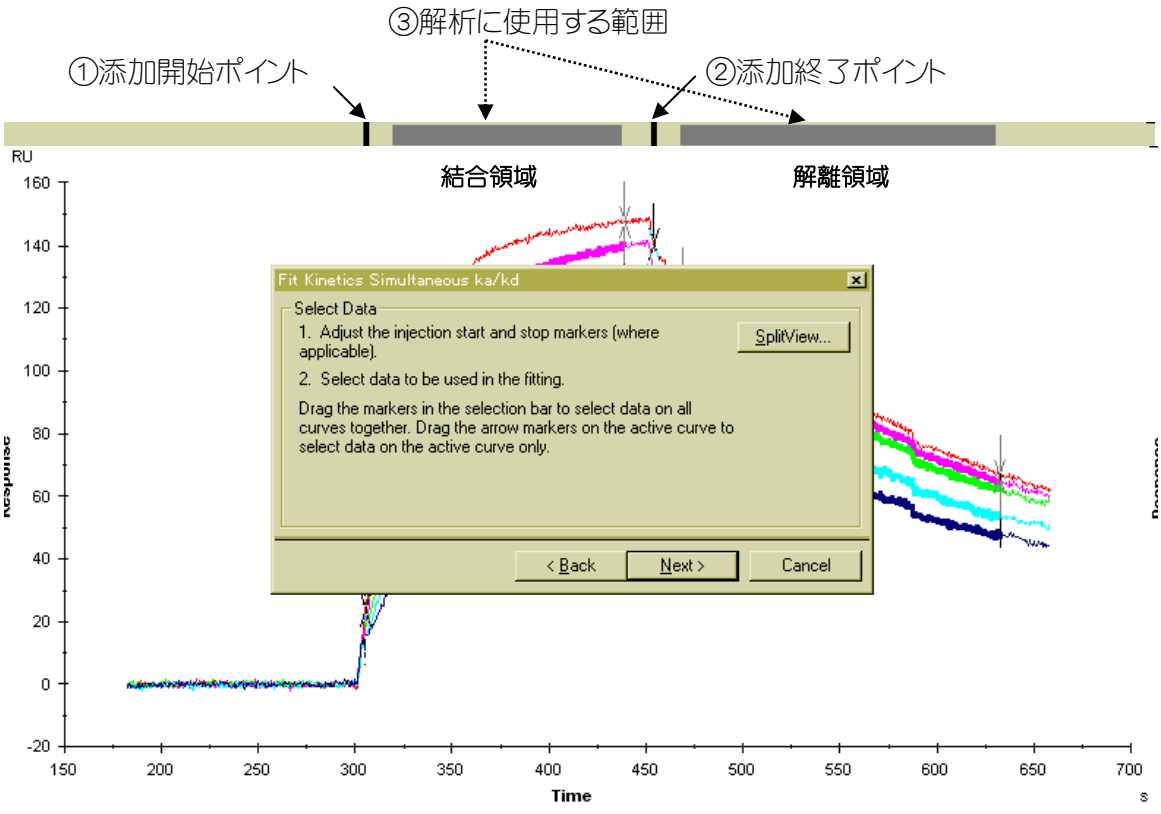
定数算出を行う前に、データの編集は必ず行う。

②解析方法

アイコン（ ）あるいは Fit → Kinetics Simultaneous k_a/k_d をクリックする。

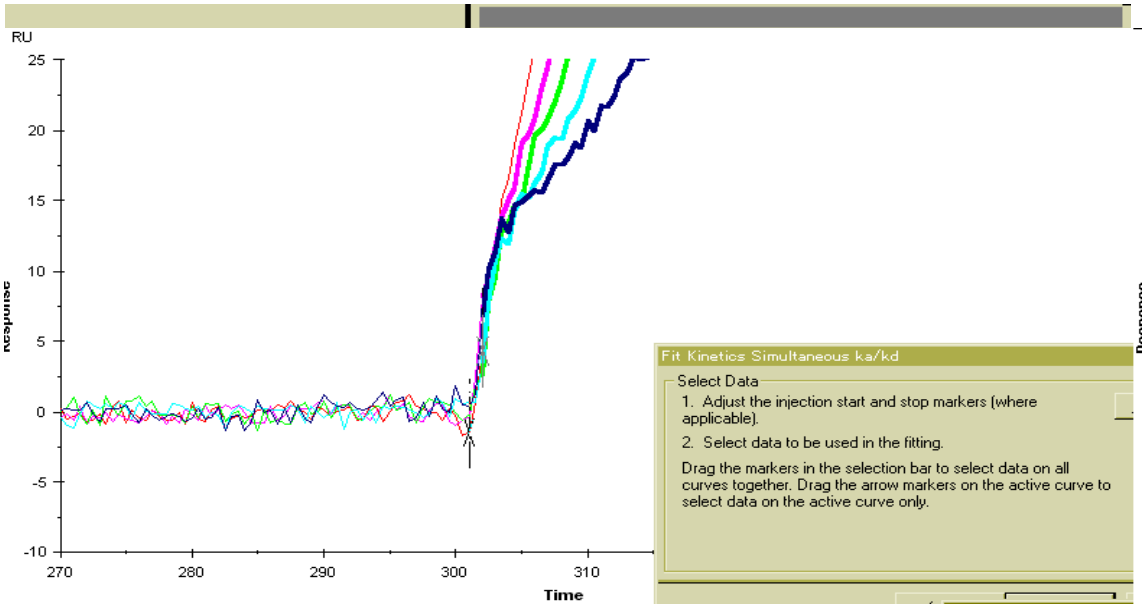

Fit Kinetics Simultaneous ka/kd
Adjust Curves
1. Delete any data which may interfere with curve presentation or curve fitting (e.g. regeneration injections, spikes etc).
Cut
Y-Transform...
2. Adjust the baseline to zero for all curves (where applicable).
< Back
Next >
Cancel

Next>をクリックする。



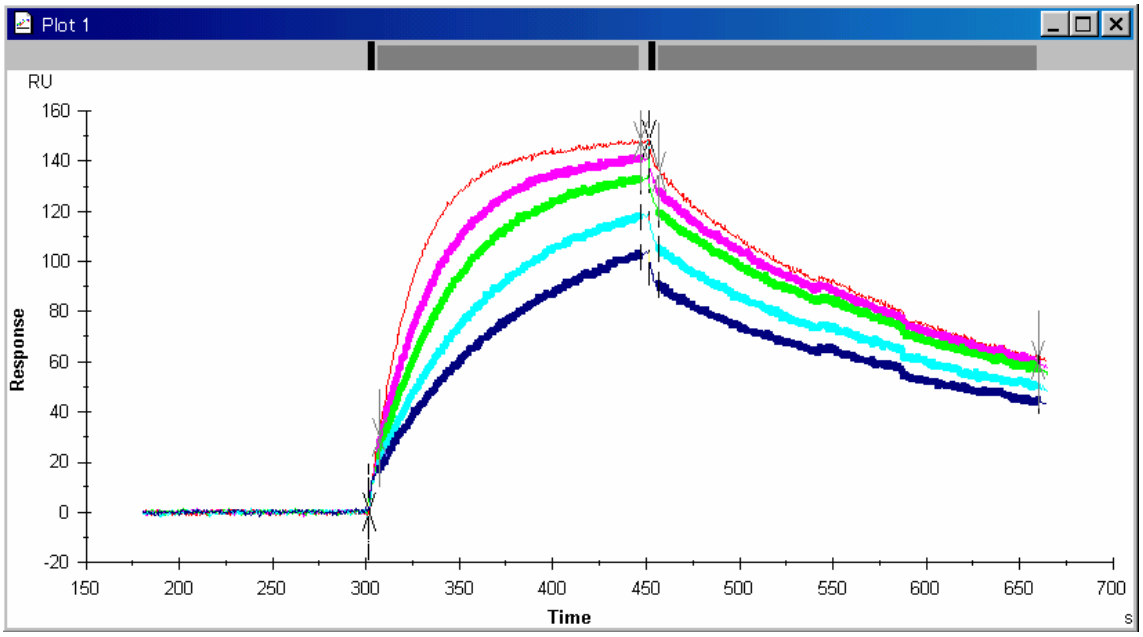
グラフ上部の選択バー中のポイントマーク（ ）を、添加開始と終了ポイントに移動する。

正確に合わせる場合は、添加開始（終了）ポイントを拡大して詳細設定する。

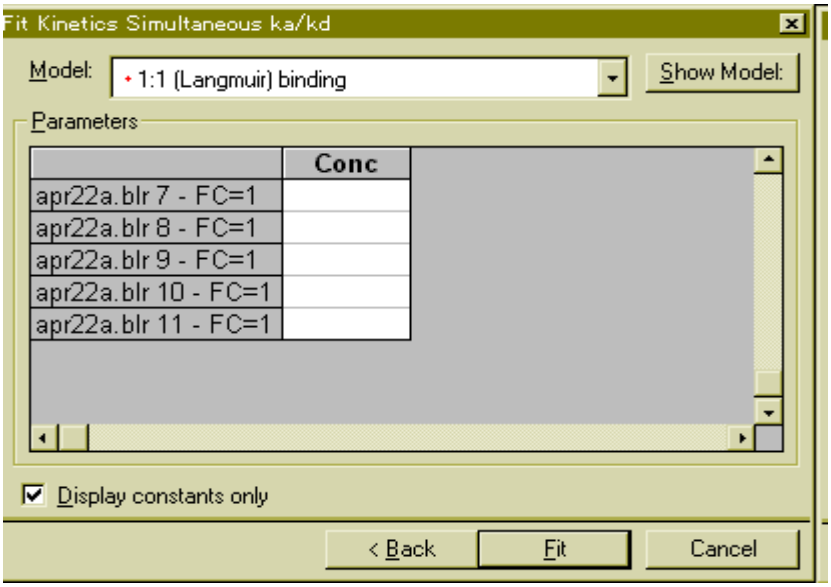


次に、解析範囲（　　）の両端を左右に広げ、結合領域および解離領域の解析範囲を設定する。（通常は添加開始直後および終了直後を数秒避けて全体を設定する。）

グラフの拡大解除は、センサーグラム以外の部分をダブルクリックする。



設定後、**Next>**をクリックする。



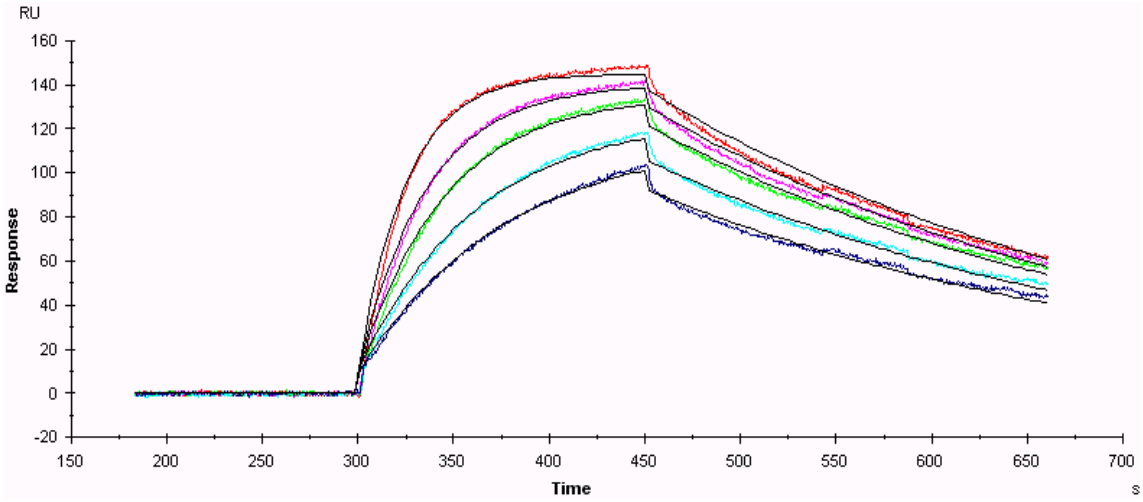
の▼で、解析に使用する反応モデル（28 頁参照）を選択する。

Conc の欄にアナライトの濃度（モル濃度）を入力する。入力時は M を省略する。

濃度の入力方法

単位	入力文字	例
aM	a	100a
fM	f	100f
pM	p	100p
nM	n	100n
uM	u	100u
mM	m	100m
M		100
kM	k	100k

濃度を入力後、**Fit** をクリックする。



黒色のセンサーグラムはフィッティングにより作成されたグラフである。
テーブルに、算出された各種パラメータが表示される。

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	RI (RU)	Conc of analyte	KA (1/M)	KD (M)	Req (RU)	kobs (1/s)
	2.44e5	3.89e-3	153			6.28e7	1.59e-8		
apr22a.blr 7 - FC=1				7.07	150n			138	0.0405
apr22a.blr 8 - FC=1				8.66	100n			132	0.0283
apr22a.blr 9 - FC=1				9.42	75n			126	0.0222
apr22a.blr 10 - FC=1				10.2	50n			116	0.0161
apr22a.blr 11 - FC=1				9.06	37.5n			107	0.013

算出パラメータ

k_a	結合速度定数
k_d	解離速度定数
Rmax	結合最大量
RI	溶液効果（bulk effect）
K_A	親和定数,
K_D	解離定数,
Req	平衡値
kobs	各濃度における速度の傾き（線形解析で使用）

フィッティングが良好な場合、データのセンサーグラムとフィッティングによって算出されたグラフがほぼ重なる。

反応様式の解説 (A:アナライト, B:リガンド)

1:1(Langmuir)binding

A + B ⇔ AB

1 対 1 の反応（1 種類のリガンドと 1 種類のアナライトとの反応）

1:1 binding with drifting baseline

A + B ⇔ AB

キャプチャー法を使用してリガンドをトラップしている場合等、ベースラインがドリフトしている状態での 1 対 1 の反応

1:1 binding with mass transfer

A + B ⇔ AB

リガンドの固定化量が多くマストランスポートリミテーション効果が影響している状態での 1 対 1 の反応

Bivalent analyte

A + B ⇔ AB

AB + B ⇔ AB2

2 価もしくは 2 量体のアナライトの反応モデル。AB 複合体形成後、AB 複合体にリガンドが 2 次的に結合する反応

Heterogeneous analyte - Competition reactions

A1 + B ⇔ A1B

A2 + B ⇔ A2B

リガンド上の 1 種類の結合部位を 2 種類のアナライトが競合する反応

Heterogeneous ligand - Parallel reaction

A + B1 ⇔ AB1

A + B2 ⇔ AB2

親和性の異なる 2 つの結合部位を持つリガンドとアナライトとの並行反応

Two state reaction(conformation change)

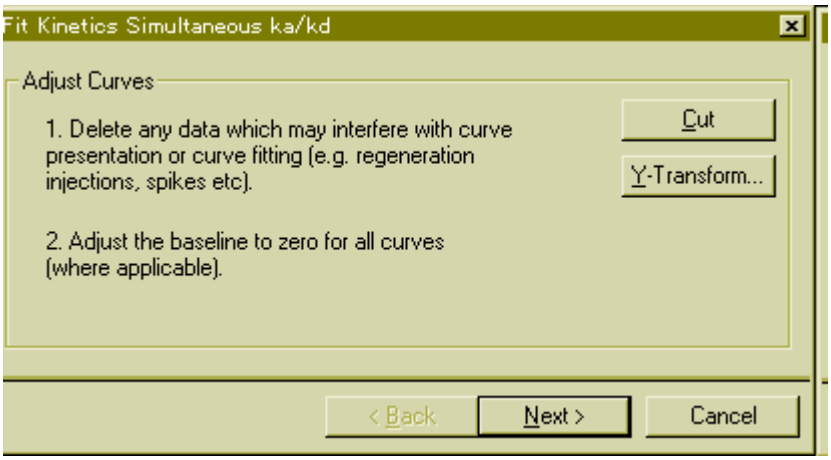
A + B ⇔ AB ⇔ AB^x

AB 複合体形成後、AB 複合体がコンフォメーション変化を起こす反応

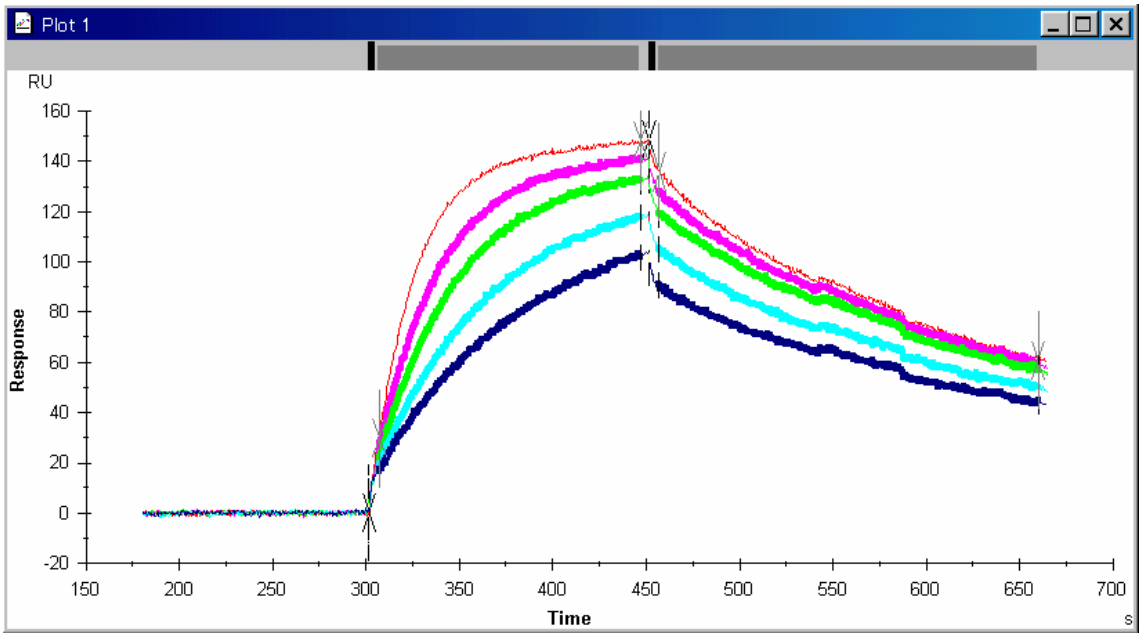
③モデルの変更（再解析）

フィッティングが良好でない場合には、解析に使用したモデルが異なっている場合があるので、モデルを変更して再解析を行う。

アイコン（ ）あるいは **Fit → Kinetics Simultaneous k_a/k_d** をクリックする。

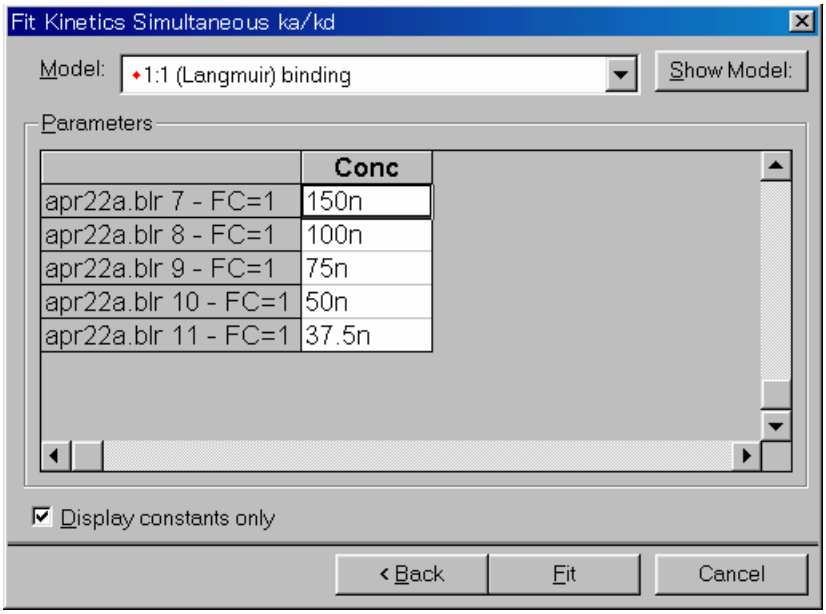


そのまま **Next>**をクリックする。



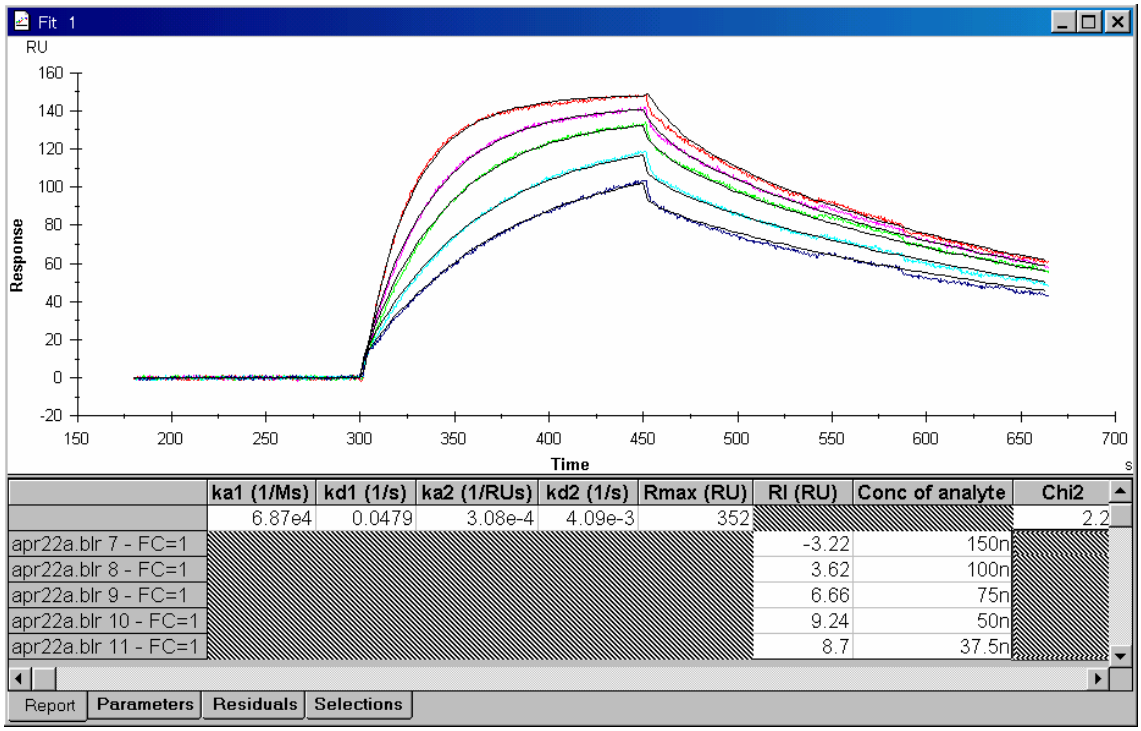
既に選択した範囲設定になっている。

Next>をクリックする。



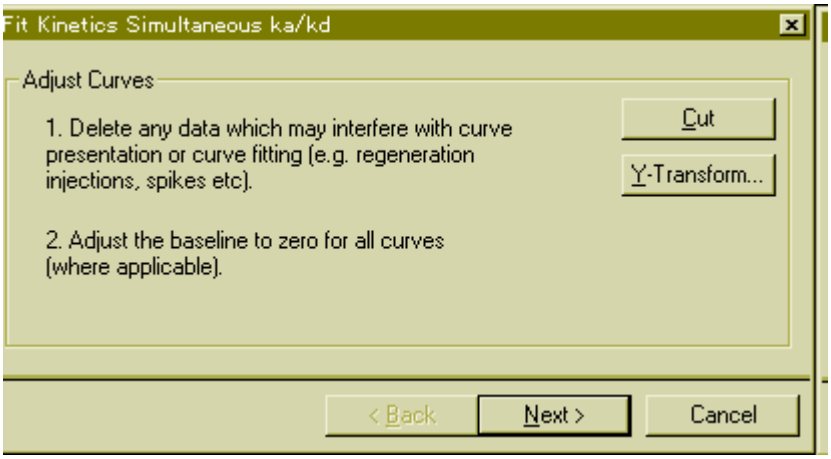
濃度はそのまま入力されている。

の▼を用いて、解析に使用する反応モデルのみ変更を行う。**Fit** をクリックする。

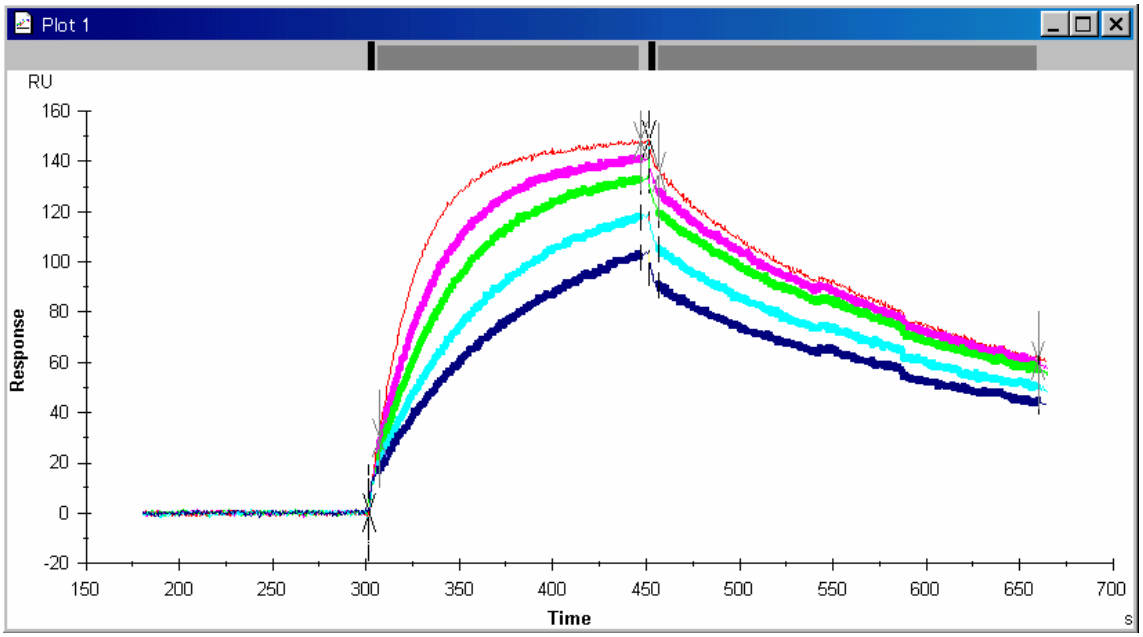


2-2-2. 同時解析－Local fitting による解析

アイコン（ ）あるいは **Fit → Kinetics Simultaneous k_a/k_d** をクリックする。

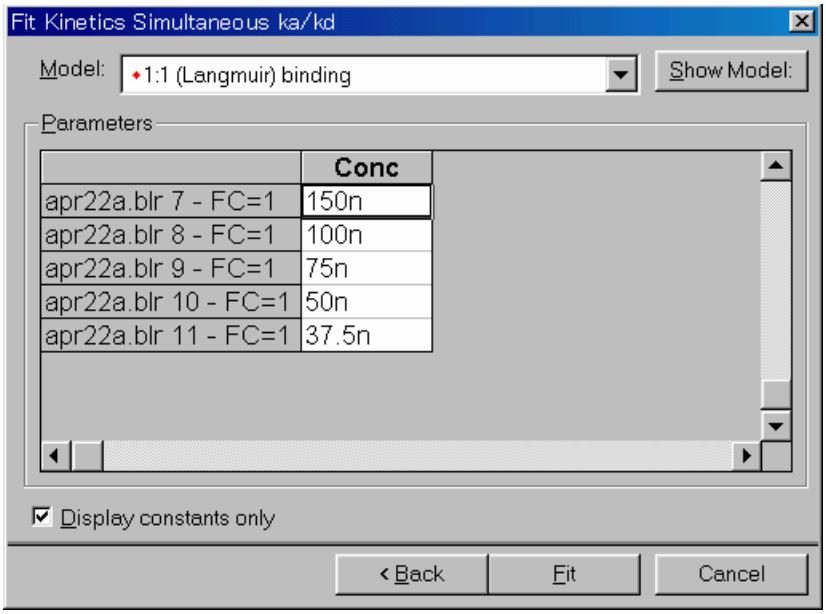

Fit Kinetics Simultaneous ka/kd
Adjust Curves
1. Delete any data which may interfere with curve presentation or curve fitting (e.g. regeneration injections, spikes etc).
2. Adjust the baseline to zero for all curves (where applicable).
Cut
Y-Transform...
< Back
Next >
Cancel

そのまま **Next>**をクリックする。

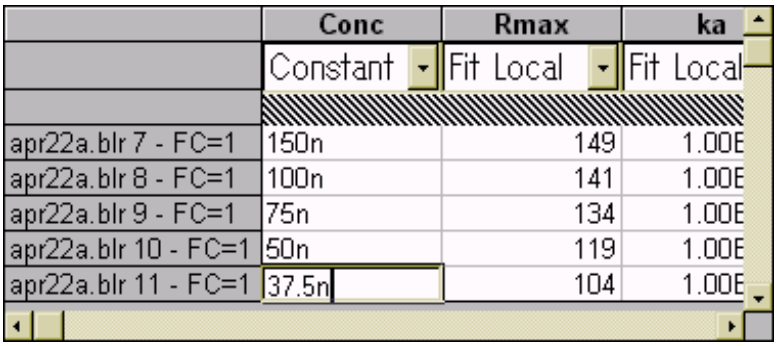


既に選択した範囲設定になっている。

Next>をクリックする。



ボックス左下の☐**Display constants only** のチェックを外す。



各種目的パラメータ（Rmax、k_a、k_d 等）のカラム下の▼をクリックし、**Fit Global** を **Fit Local** に変更する。

変更後、**Fit** をクリックする。

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	RI (RU)	Conc of analyte	KA (1/M)	KD (M)	Req (RU)	kobs (1/s)
apr22a.blr 7 - FC=1	2.29e5	3.92e-3	150	12.3	150n	5.84e7	1.71e-8	135	0.0383
apr22a.blr 8 - FC=1	2.31e5	3.78e-3	151	13.3	100n	6.1e7	1.64e-8	130	0.0269
apr22a.blr 9 - FC=1	2.31e5	3.71e-3	152	12.9	75n	6.23e7	1.6e-8	125	0.0211
apr22a.blr 10 - FC=1	2.25e5	3.73e-3	156	13.2	50n	6.04e7	1.66e-8	117	0.015
apr22a.blr 11 - FC=1	2.16e5	3.54e-3	156	12.9	37.5n	6.1e7	1.64e-8	109	0.0117

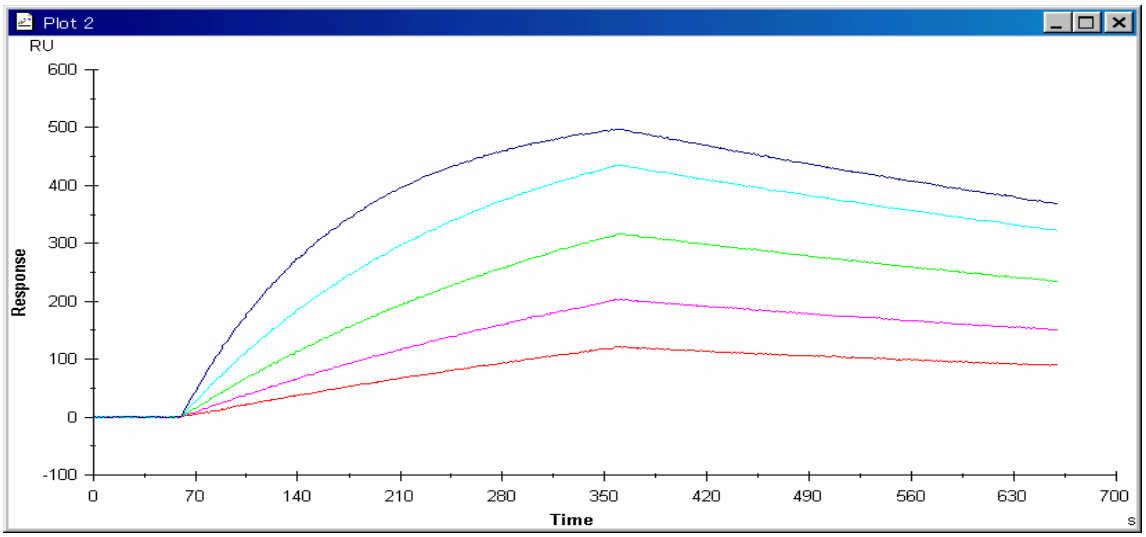
それぞれのセンサーグラムからのパラメータの値が表示される。
Rmax、k_a、k_d 等の値のばらつきを確かめる。

2-2-3. 同時解析の注意点

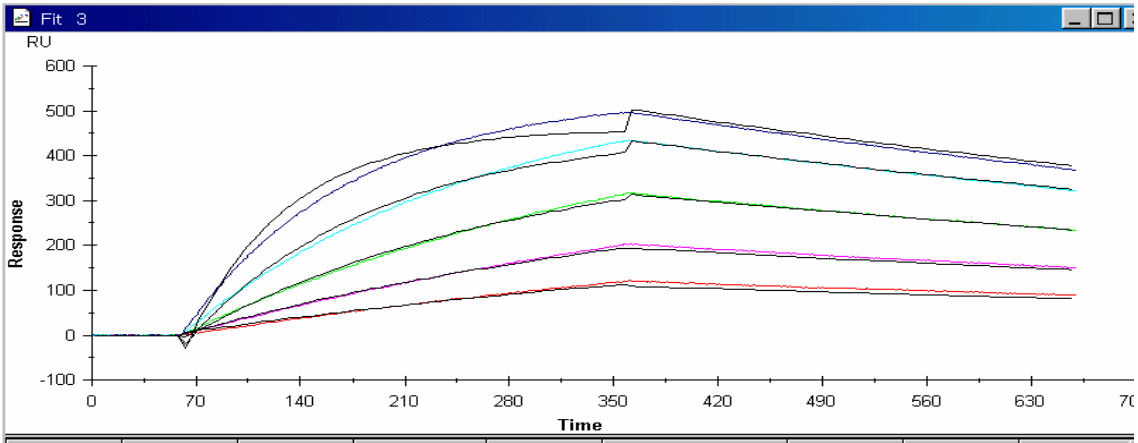
Global fitting は複数のセンサーグラムから 1 組の kinetics パラメータを算出するため、客観性の高いパラメータが算出されるという利点があるが、すべてのセンサーグラムにおいて k_a, k_d, Rmax などのパラメータを同一の数値であるという前提で解析を行っている。しかし、全センサーグラムでそれらのパラメータが一致しない場合がある。たとえば、再生条件が過激でリガンドの失活が見られる場合、Rmax はサイクルごとに変動する。

(例) Rmax がサイクルごとに異なる場合

Rmax は、リガンドに対するアナライトの最大結合量（RU）であり、理想的な実験系の場合は、同一セルを使用している限り、いずれのサイクルのセンサーグラムにおいても同一のはずである。ところが、アナライトの再生が不十分だったり、再生によりリガンドの活性が低下している場合には、サイクルごとに Rmax は低下する。

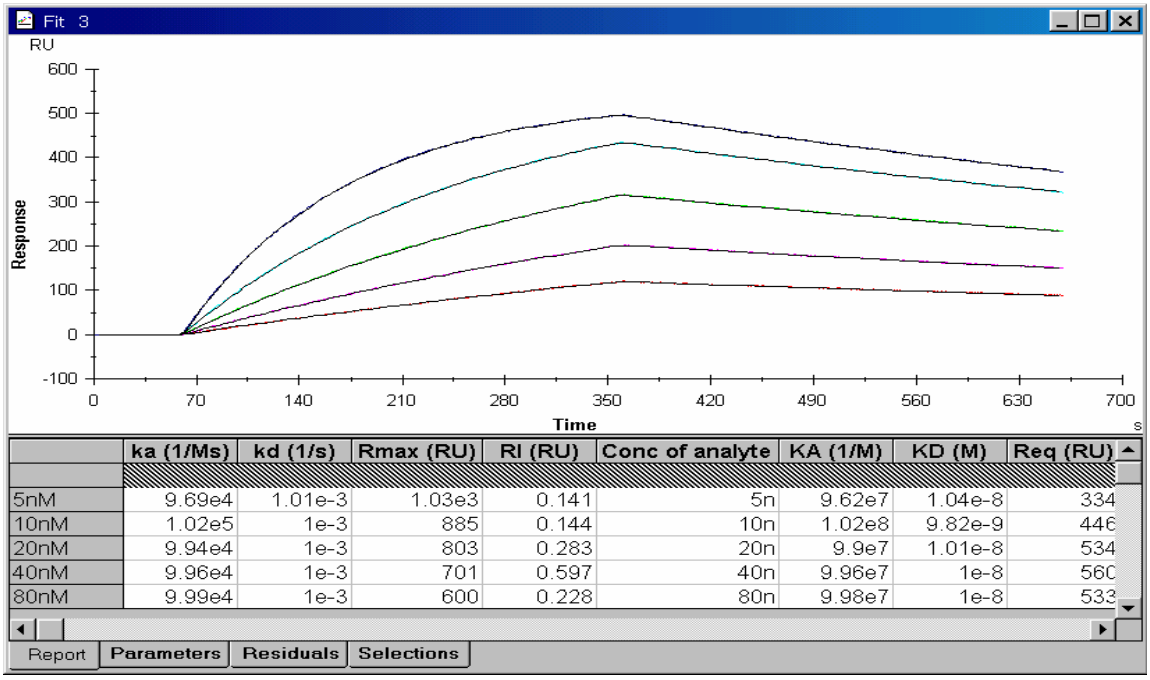


上のセンサーグラムは 1:1 のモデルの反応であるが、再生条件が悪く Rmax がサイクルごとに低下している。これを、Global fitting で解析すると良好な Fitting が得られない。



	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	RI (RU)	Conc of analyte	KA (1/M)	KD (M)	Req (RU)
	1.74e5	9.68e-4	545			1.8e8	5.57e-9	
5nM				5.09	5n			258
10nM				1.05	10n			350
20nM				-9.78	20n			426
40nM				-26.8	40n			479

しかし、このセンサーグラムを Local fitting で解析するとフィッティングが良好となる。



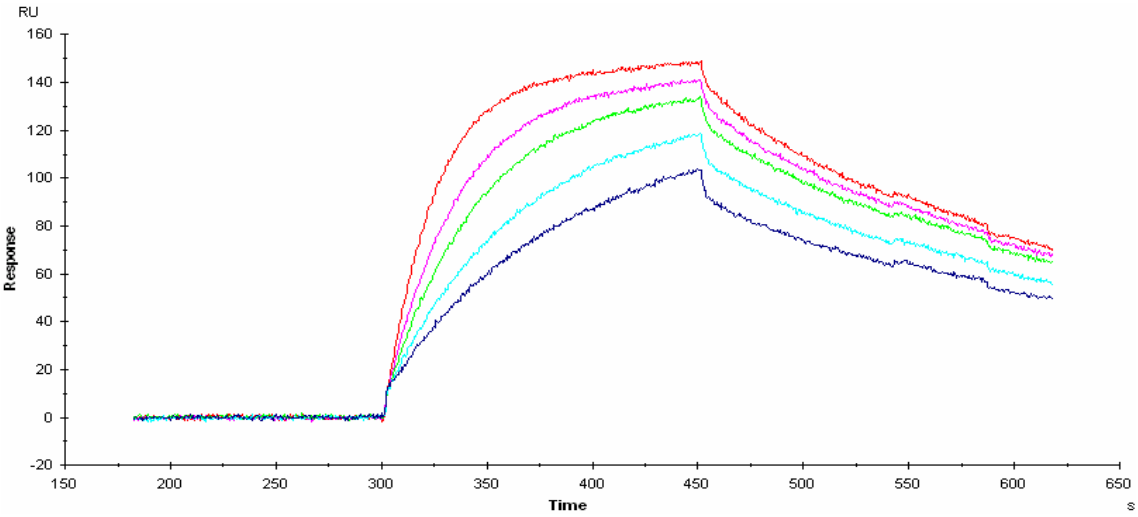
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	RI (RU)	Conc of analyte	KA (1/M)	KD (M)	Req (RU)
5nM	9.69e4	1.01e-3	1.03e3	0.141	5n	9.62e7	1.04e-8	334
10nM	1.02e5	1e-3	885	0.144	10n	1.02e8	9.82e-9	446
20nM	9.94e4	1e-3	803	0.283	20n	9.9e7	1.01e-8	534
40nM	9.96e4	1e-3	701	0.597	40n	9.96e7	1e-8	560
80nM	9.99e4	1e-3	600	0.228	80n	9.98e7	1e-8	533

Rmax はサイクルごとに低下するが、その他のパラメータは変化しないことがわかる。

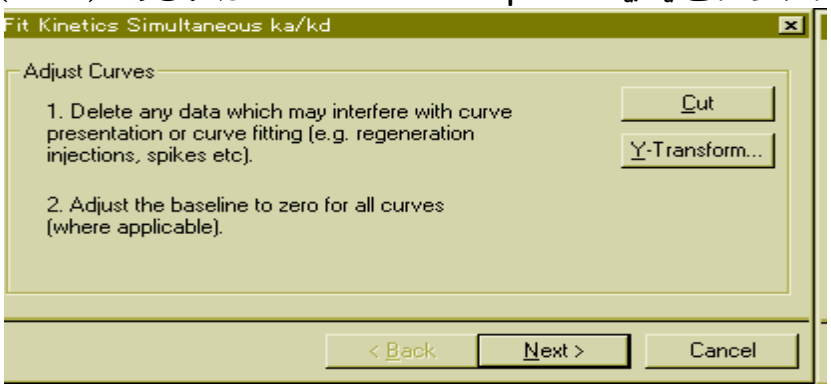
Rmax、k_a, k_d 等のパラメータが全サイクルで同一でない場合、Global fitting による解析は避ける。

2-2-4. 分割解析

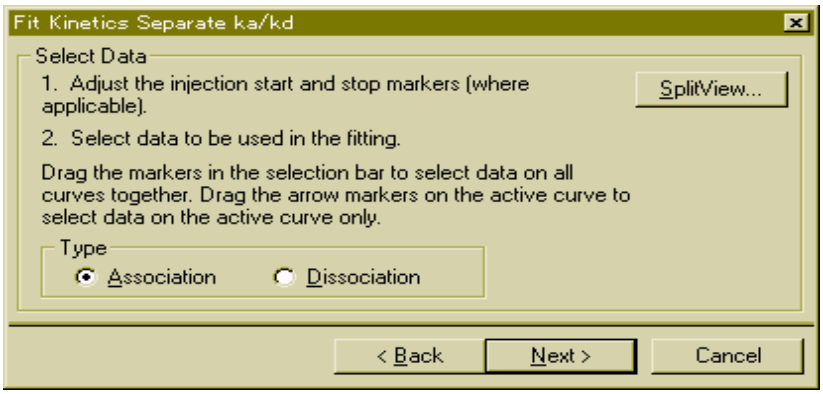
ファイル C:/Program Files/BIAeval/ Apr22 を使用して説明する。
ファイルの呼び出しおよびデータ編集を行う。



アイコン（ ）あるいは **Fit → Kinetics Separate k_a/k_d** をクリックする。

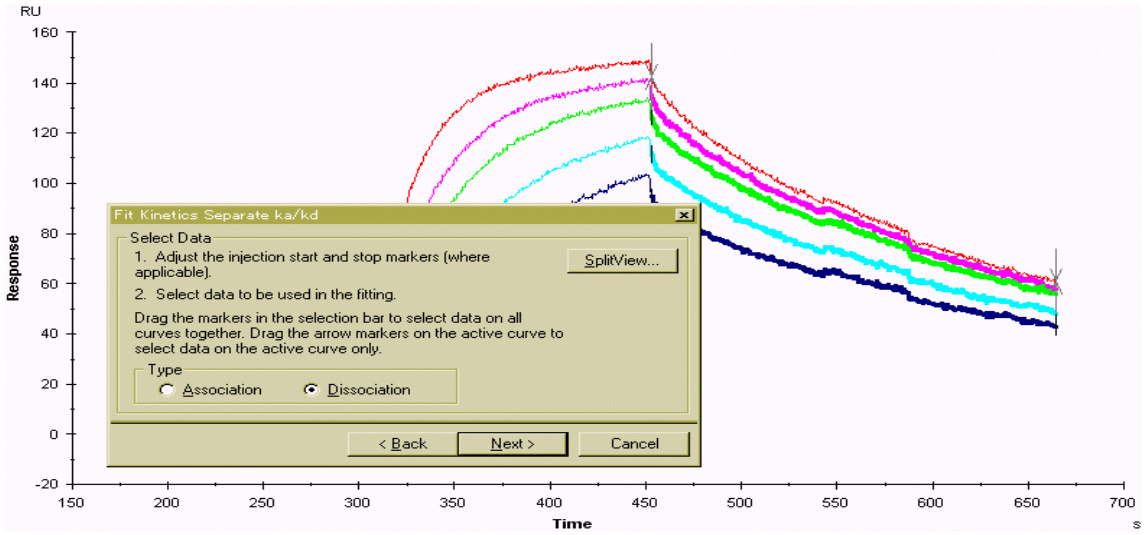

Fit Kinetics Simultaneous ka/kd
Adjust Curves
1. Delete any data which may interfere with curve presentation or curve fitting (e.g. regeneration injections, spikes etc).
Cut
Y-Transform...
2. Adjust the baseline to zero for all curves (where applicable).
< Back
Next >
Cancel

Next>をクリックする。

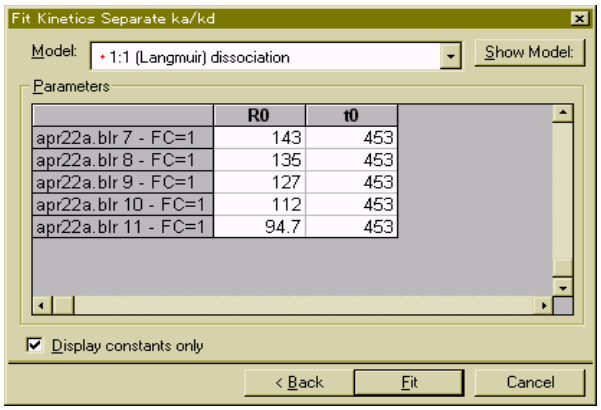

Fit Kinetics Separate ka/kd
Select Data
1. Adjust the injection start and stop markers (where applicable).
SplitView...
2. Select data to be used in the fitting.
Drag the markers in the selection bar to select data on all curves together. Drag the arrow markers on the active curve to select data on the active curve only.
Type
Association
Dissociation
< Back
Next >
Cancel

中の **Dissociation** をチェックする。次に、解離領域（■）の両端を左右に移動させ、フィッティング領域を設定する。

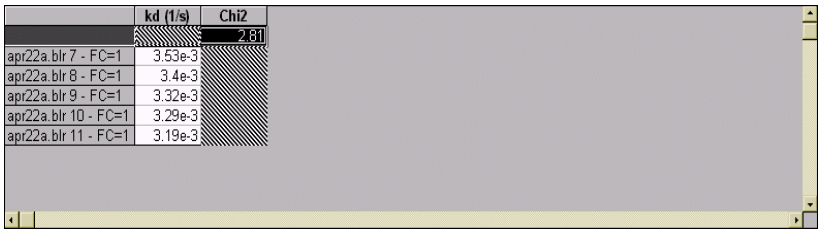
解離反応領域



Next>をクリックする。



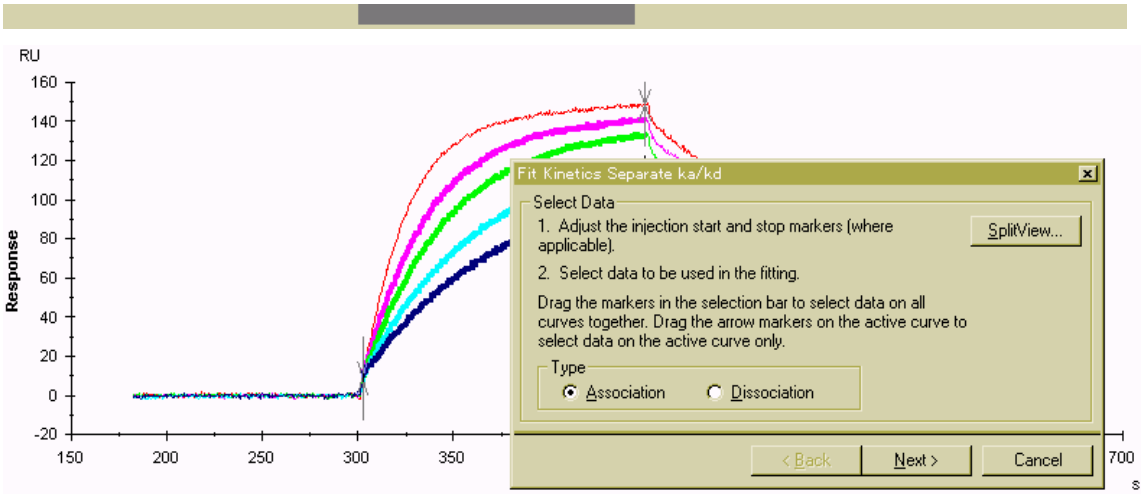
Fit をクリックする。



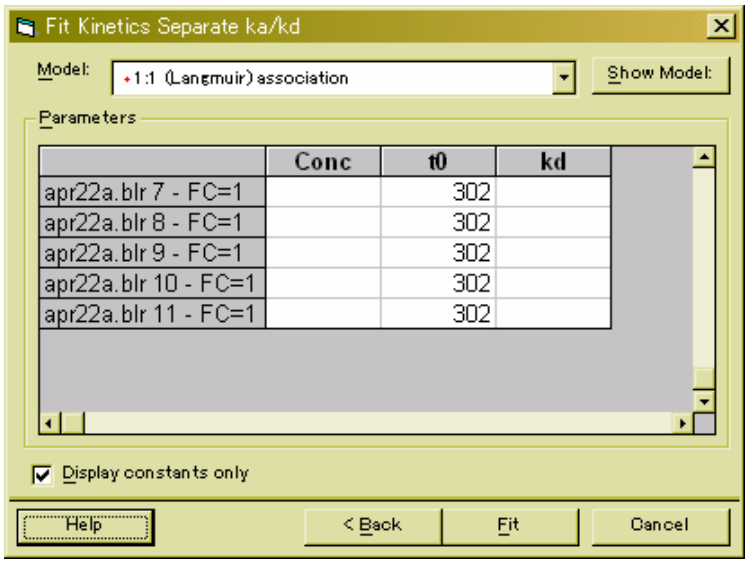
解離速度定数（k_d）が算出される。
再び、アイコン（ ）あるいは **Fit → Kinetics Separate k_a/k_d** をクリックする。

中の **Association** をチェックする。次に、結合領域（ ）の両端を左右に移動させ、フィッティング範囲を設定する。

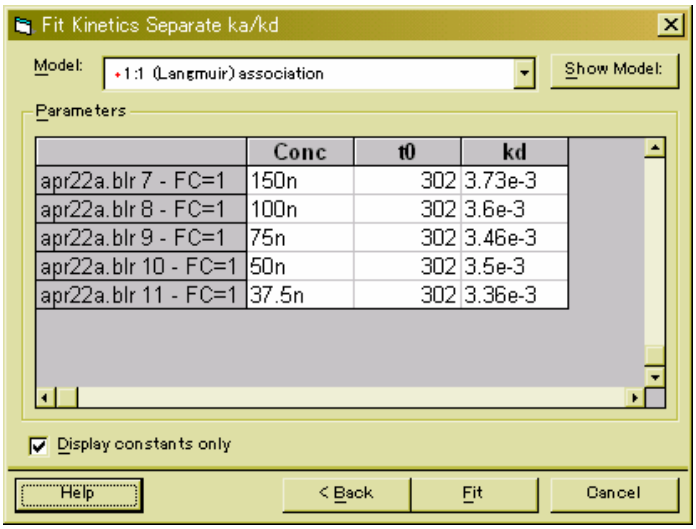
結合反応領域



Next>をクリックする。



アナライト濃度と、手前で算出した k_d（解離速度定数）入力する。



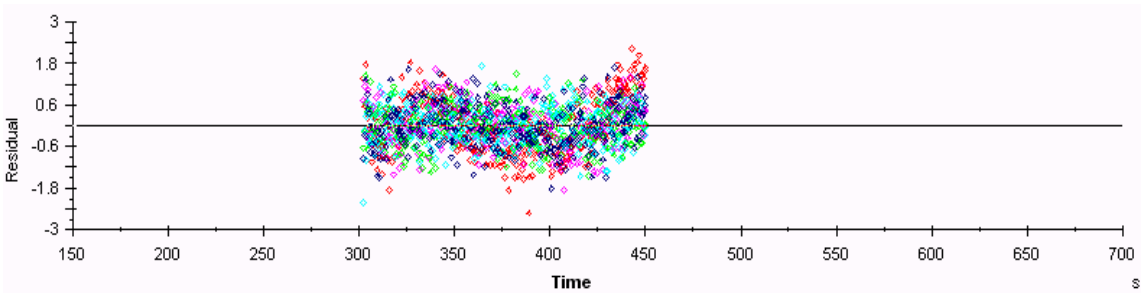
Fit をクリックする。

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	RI (RU)	Conc of analyte	KA (1/M)	KD (M)	Req (RU)	kobs (1/s)	Chi2
										0.469
apr22a.blr 7 - FC=1	2.52e5	3.73e-3	156	4.7	150n	6.77e7	1.48e-8	142	0.0416	
apr22a.blr 8 - FC=1	2.53e5	3.6e-3	154	6.86	100n	7.04e7	1.42e-8	135	0.0289	
apr22a.blr 9 - FC=1	2.59e5	3.46e-3	154	6.84	75n	7.5e7	1.33e-8	131	0.0229	
apr22a.blr 10 - FC=1	2.54e5	3.5e-3	153	8.93	50n	7.26e7	1.38e-8	120	0.0162	
apr22a.blr 11 - FC=1	2.42e5	3.36e-3	151	10.4	37.5n	7.19e7	1.39e-8	110	0.0124	

フィッティングが良好であることの判断基準
①センサーグラムとフィッティングによって算出されたグラフがほぼ重なる。

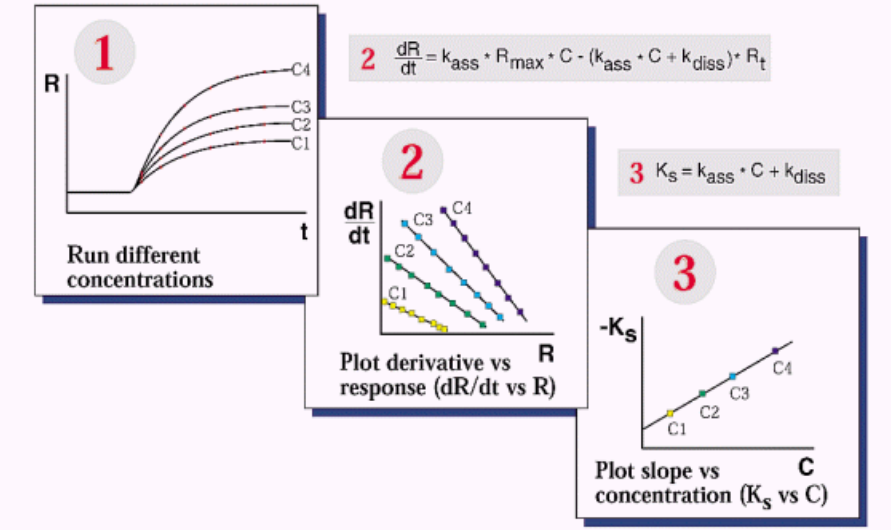
②テーブル下の Residuals (

) をクリックする。
X 軸＝0 の直線を中心に上下に均等にばらついている。



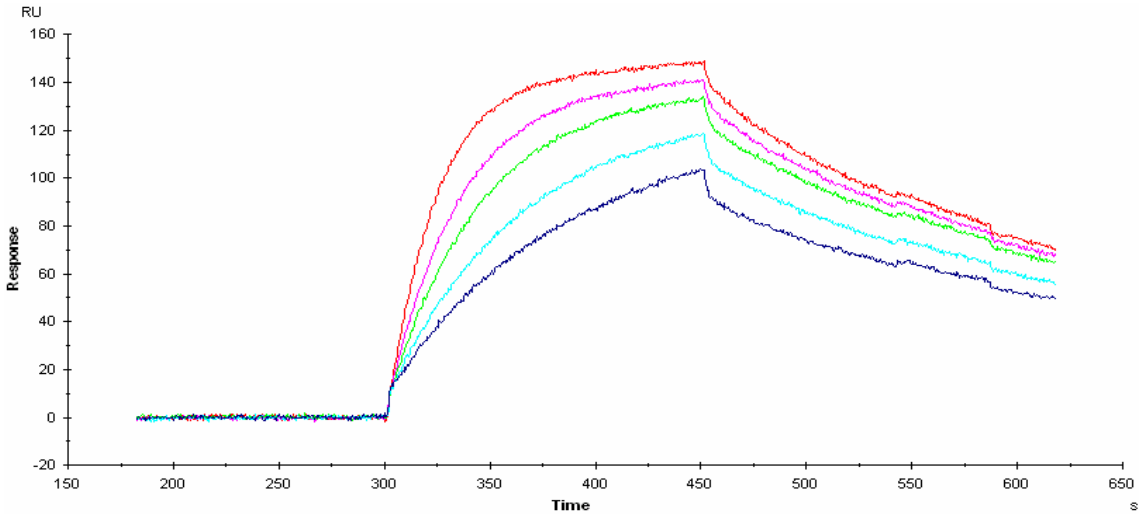
2-3. 線型解析

各濃度における速度の傾きから結合速度定数（k_a）および解離速度定数（k_d）を算出する方法である。



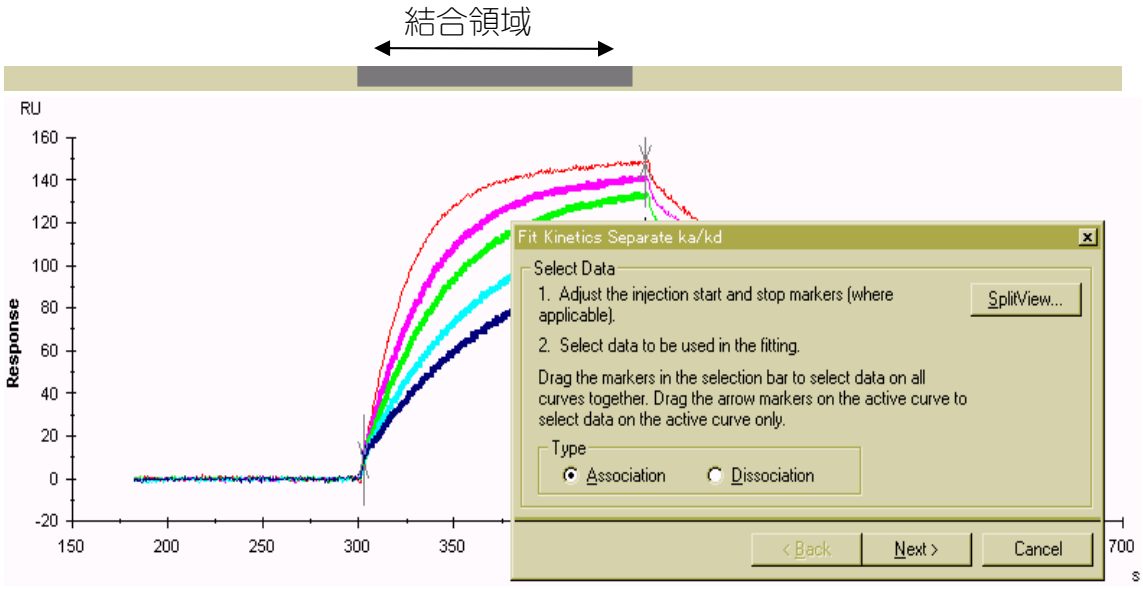
グラフ 3 において、グラフの傾きが結合速度定数（k_a）に、Y 軸との切片が解離速度定数（k_d）となる。しかし、k_d は、極めて原点 0 に近いため、データの信頼性が低いことが指摘されている。

ファイル C:/Program files/BIAeval/ Apr22 を使用して説明する。
ファイルの呼び出しおよびデータ編集を行う。

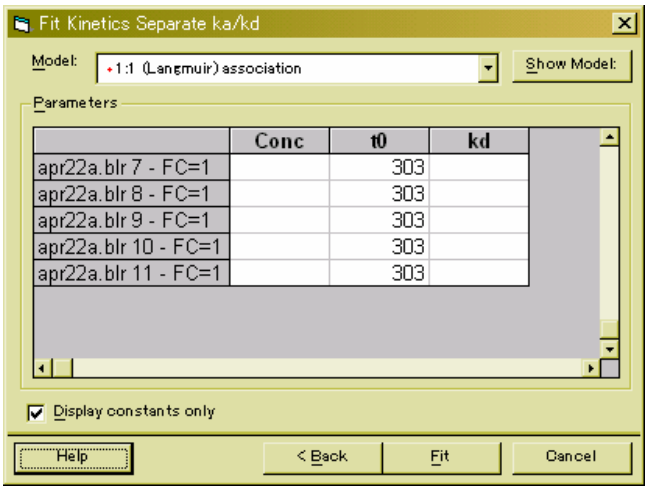


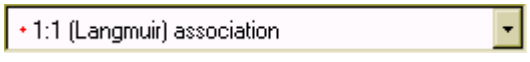
アイコン（ ）あるいは **Fit → Kinetics Separate k_a/k_d** をクリックする。

中の **Association** をチェックする。次に、結合領域（ ）の両端を左右に移動させ、反応領域を設定する。



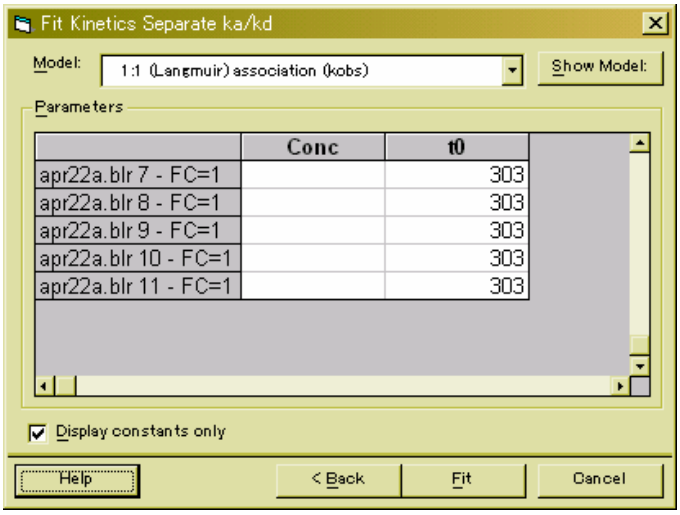
Next>をクリックする。



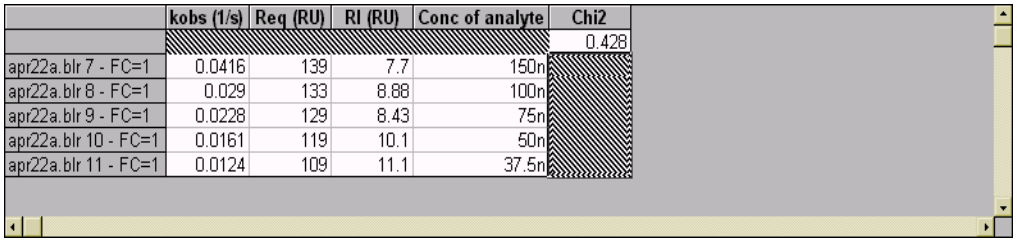


の▼を用いて、解析モデルの選択を行う。

1:1(Langmuir) association(kobs)を選択する。

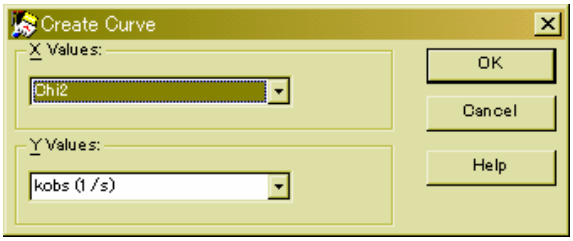


アナライト濃度を入力し、**Fit** をクリックする。

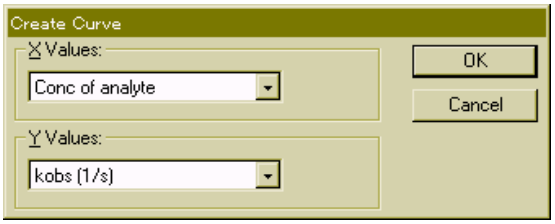


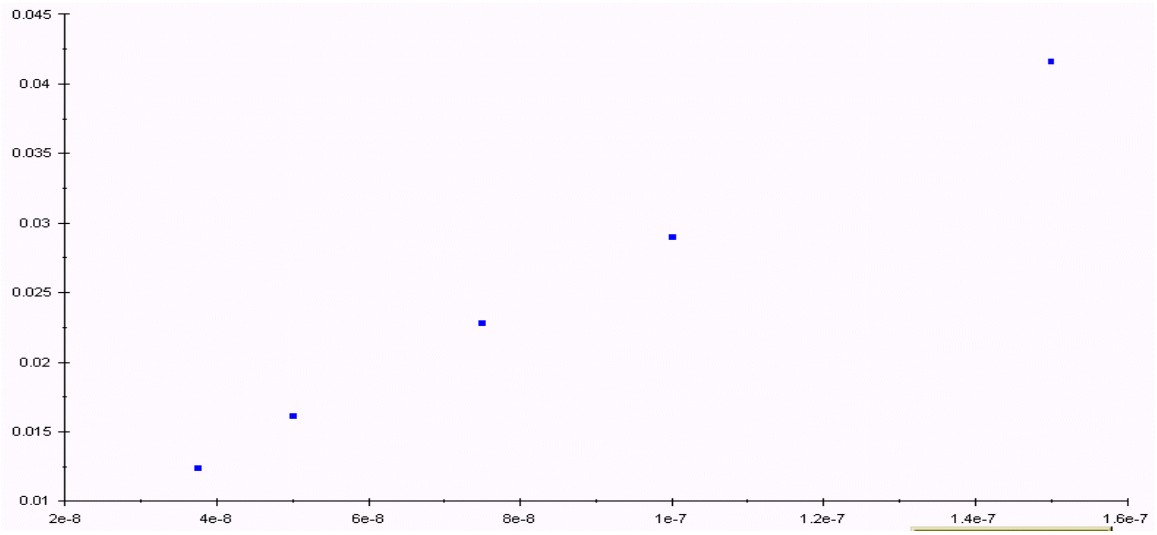
	kobs (1/s)	Req (RU)	RI (RU)	Conc of analyte	Chi2
					0.428
apr22a.blr 7 - FC=1	0.0416	139	7.7	150n	
apr22a.blr 8 - FC=1	0.029	133	8.88	100n	
apr22a.blr 9 - FC=1	0.0228	129	8.43	75n	
apr22a.blr 10 - FC=1	0.0161	119	10.1	50n	
apr22a.blr 11 - FC=1	0.0124	109	11.1	37.5n	

Fit → Plot Parameters...をクリックする。

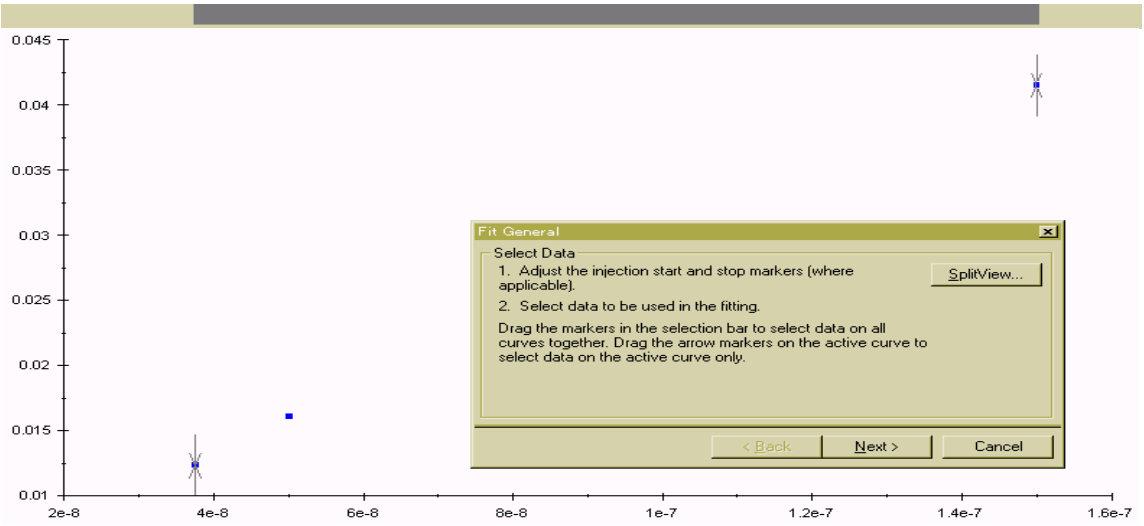


▼を用いて、X 軸を **Conc of analyte** に設定する。同様に Y Values:は、Y 軸を **kobs［1/s］**に設定し、**OK** をクリックする。

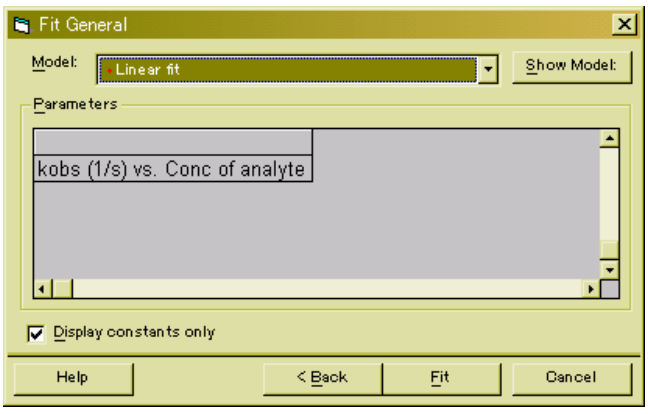




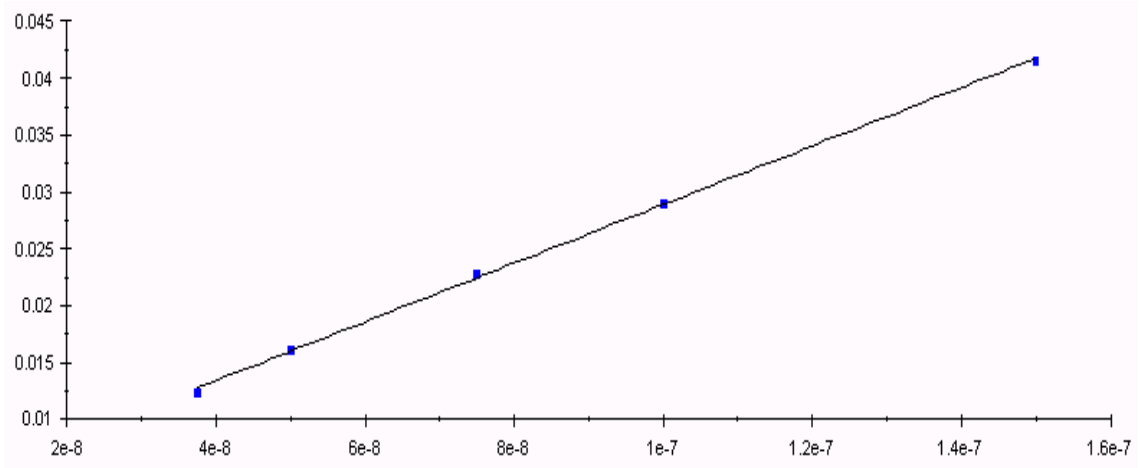
アイコン（ ）あるいは **Fit → General ...**をクリックする。



選択領域（ ）を左右に拡大し、プロットすべてを選択し、**Next>**をクリックする。



の▼を用いて、解析モデルに・**Linear fit** を選択し、**Fit** をクリックする。



	Slope	Intercept	Chi2
			1.08E-07
kobs (1/s) vs. Conc of analyte	2.58e5	3.1e-3	

Slop が結合速度定数（k_a）、**Intercept** が解離速度定数（k_d）に相当する。

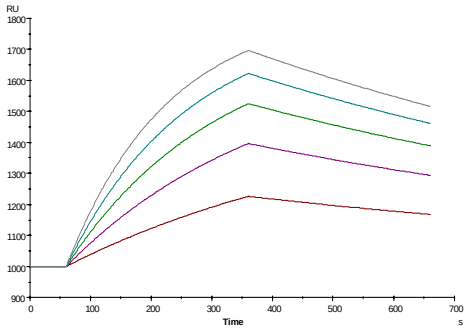
3. 平衡値からの解離定数の算出（Affinity 解析）

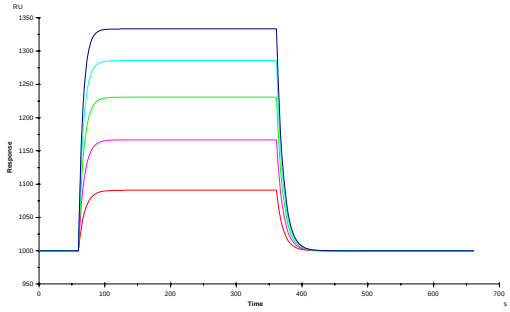
親和性の低い相互作用の場合（特に解離が速い場合）、反応はきわめて速く平衡状態(Req)へと移行する。センサーグラムは箱型となる。

（例）

k_a = 1×10^5 $M^{-1}s^{-1}$
k_d = 1×10^{-3} s^{-1}

k_a = 1×10^5 $M^{-1}s^{-1}$
k_d = 1×10^{-1} s^{-1}



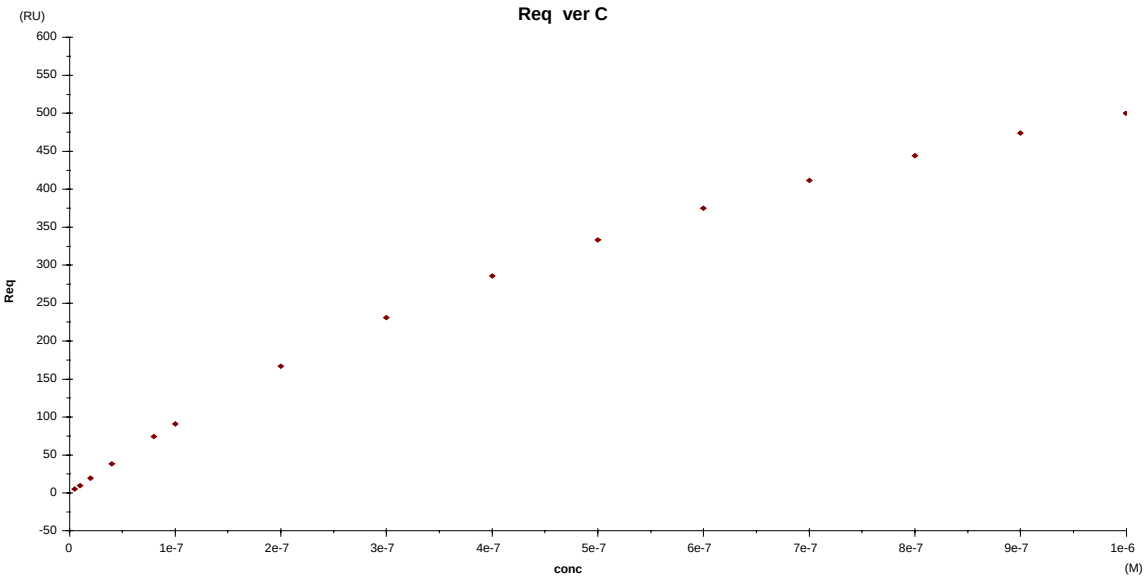


そのため、傾きが得られる結合領域および解離領域は極めて短く、速度論的解析（kinetics parameter の算出）は困難である。

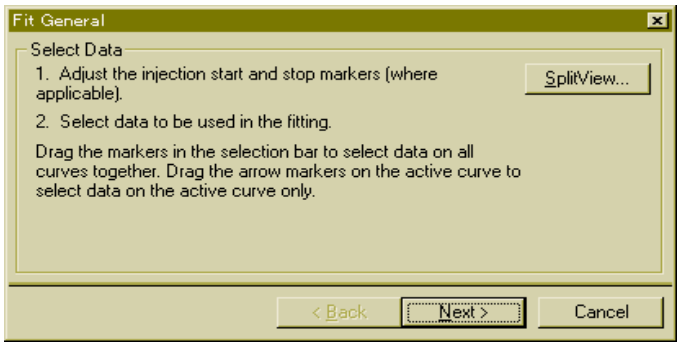
このような場合、アナライト濃度（C）に対する平衡値（Req）のプロットから、親和定数（K_A）あるいは解離定数（K_D）を算出する。

平衡状態では、以下の関係式が成り立つ。

$$Req = K_A \cdot C \cdot Rmax / (1+K_AC)$$

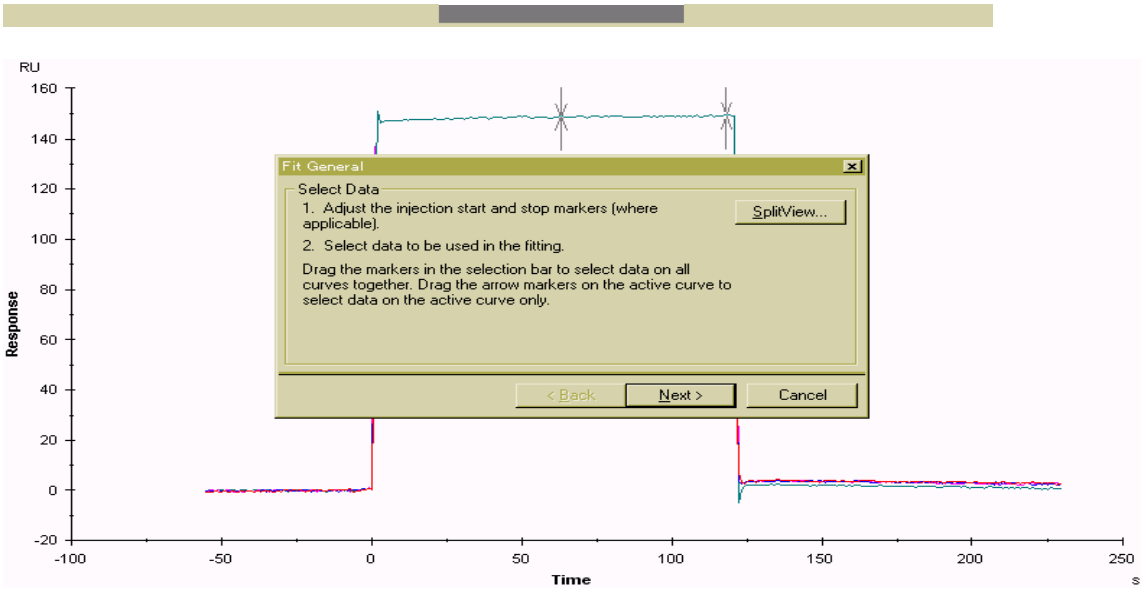


アイコン（ ）あるいは **Fit → General** をクリックする。



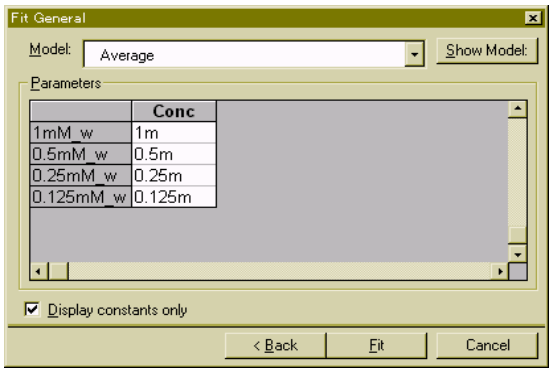
センサーグラム上部の選択領域（■）を移動、もしくは選択領域（■）の両端を左右に調整し、平衡領域を設定する。

反応平衡領域



Next>をクリックする。

の▼を用いて、解析モデルに **Average** を選択する。



(注) モデルが存在しない場合は、5 章.モデルの追加を参照のこと。

アナライトの濃度を入力し、**Fit** をクリックする。

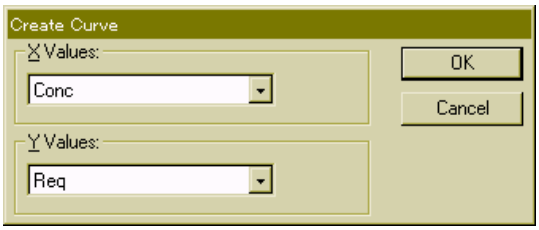
	Chi2
	0.0564
1mM w	
0.5mM w	
0.25mM w	
0.125mM w	

テーブル下の Parameters (

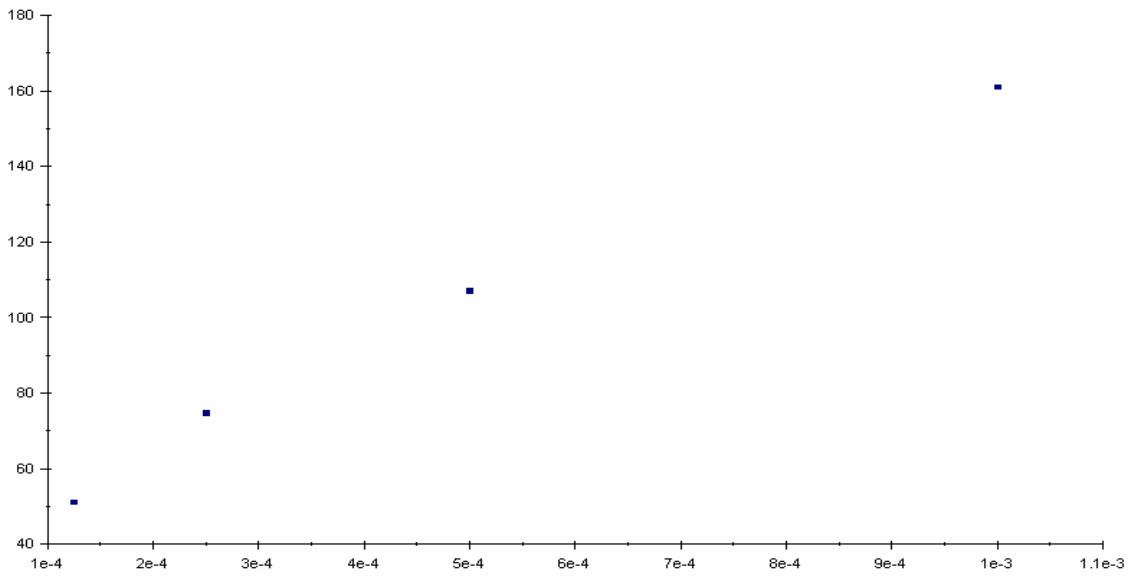
) をクリックする。

	Req	SE(Req)	Conc
GLCNAC Fc=1 - 1	164	0.0454	1m
GLCNAC Fc=1 - 2	131	0.0454	0.5m
GLCNAC Fc=1 - 3	100	0.0454	0.25m
GLCNAC Fc=1 - 4	74.7	0.0454	0.125m

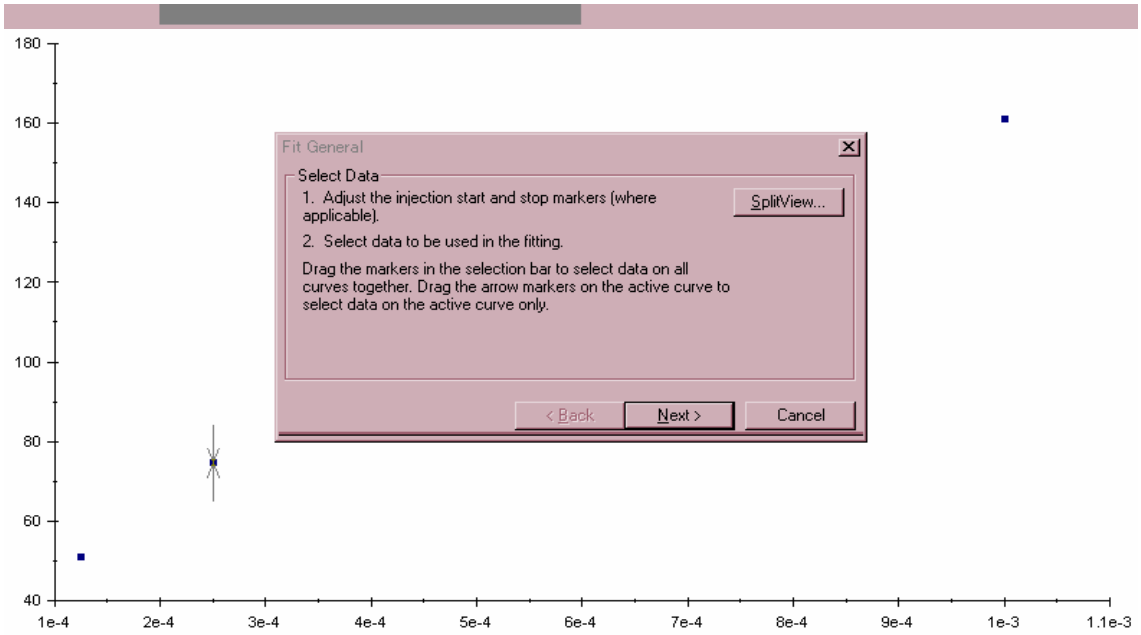
Fit → Plot Parameters...をクリックする。



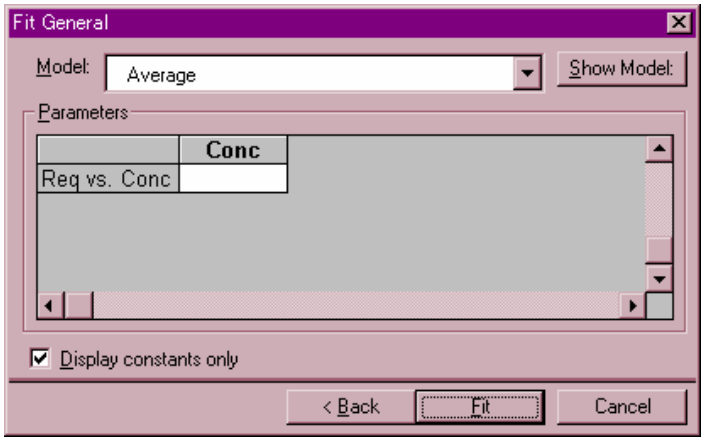
▼を用いて、X 軸に **Conc**、Y Values:に **Req** を設定し、**OK** をクリックする。



アイコン（ ）あるいは **Fit → General** をクリックする。

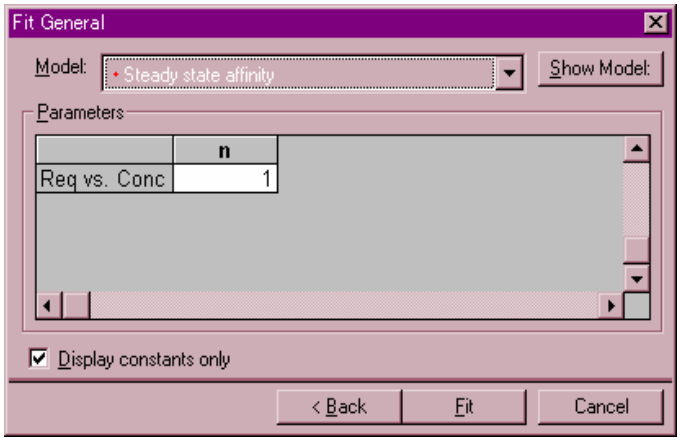


選択領域（ ）を左右に広げ、プロットすべてを選択し、**Next>**をクリックする。



の▼を用いて、モデルの選択を行う。

Steady state affinity を選択する。



Fit をクリックする。

	KA(1/M)	KD(M)	Rmax	n	Chi2
	4.35e3	2.3e-4	198		32.4
Req vs. Conc				1	

親和定数（K_A）および解離定数（K_D）が算出される。

4. 濃度測定

Biacore は、反応速度論的解析のみならず、濃度測定も可能である。まず、濃度を測定したい物質に特異的に反応する物質（多くは抗体）をセンサーチップ表面に固定化し、既知濃度のスタンダードサンプルで結合量を測定し検量線を作成する。次に、未知濃度のサンプルについて、同様に測定を行い、結合量を測定する。そのレスポンスを検量線と対応させ、濃度を決定する。

4-1. 実験方法

既知濃度のスタンダードサンプルと未知濃度のサンプルについて結合量を測定する。未知濃度のサンプルは、スタンダードサンプルで作成する検量線内に入る濃度を予測し希釈する。濃度予想が困難なサンプルについては、数段階の希釈系列を作る。

（プログラム作成時の注意点）
①操作ブロック中で、濃度についての **KEYWORD** の設定を行う。

（例）

KEYWORD	ng/ml	%conc

ng/ml は、解析用のソフトウェアで作成される Excel 形式のシートのカラムタイトルとなる。ug/ml や nM、uM 等も使用できる。
②メインブロック中で濃度を入力する際、単位は省略する。
③メインブロック中で未知濃度サンプルの濃度入力は、文字列（unknown1 や sample1 等自由に作成可能）を使用する。

プロトコール例
下記の濃度測定プログラムを作成する場合
3 種類の未知濃度サンプル濃度を uk1,2,3 とする。再現性を確認するために、各 2 回繰り返し測定を行う。

```
DEFINE APROG            conc
        PARAM  %pos     %conc
        KEYWORD         ng/ml   %conc
        CAPTION         %conc   ng/ml
        FLOW            5
*       INJECT          %pos    15              !sample
-0:10   RPOINT  baseline -b
3:10    RPOINT  bound
*       INJECT          R2F3    5               !regeneration solution
1:30    RPOINT  regeneration
END

MAIN
        DETECTION       2-1
        APROG   conc    R2A1    10,000
        APROG   conc    R2A2    5,000
        APROG   conc    R2A3    2,500
        APROG   conc    R2A4    1,250
        APROG   conc    R2A5    625
        APROG   conc    R2A1    10,000
        APROG   conc    R2A2    5,000
        APROG   conc    R2A3    2,500
        APROG   conc    R2A4    1,250
        APROG   conc    R2A5    625
        APROG   conc    R2B1    uk1
        APROG   conc    R2B2    uk2
        APROG   conc    R2B1    uk3
        APROG   conc    R2B2    uk1
        APROG   conc    R2B1    uk2
        APROG   conc    R2B2    uk3
        APPEND  Standby
END
```

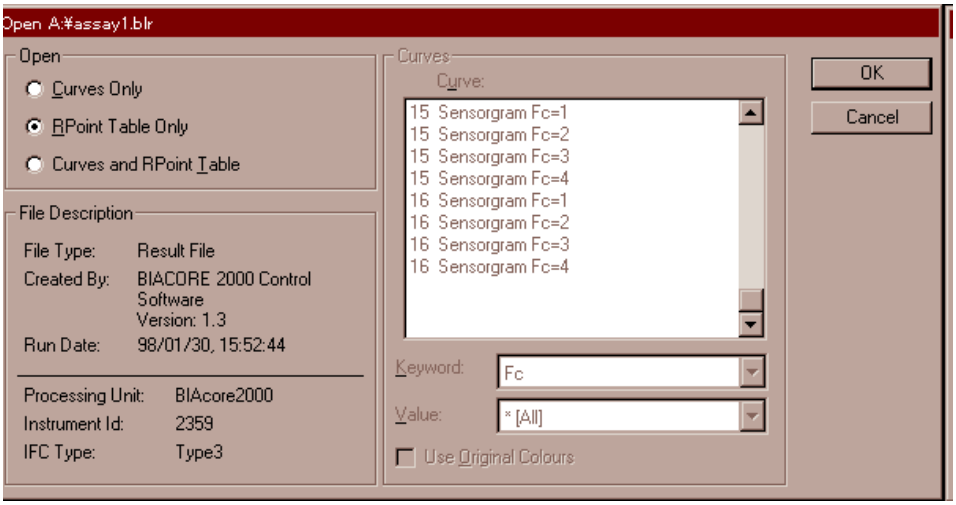
同一の名前は同一サンプルと認識される。

4-2. 解析方法

4-2-1.ファイルの呼び出し

4-1. で得られたデータを用いて、**BIAeavaluation** ソフトウェアで解析を行う。

File → **Open** をクリックし、解析するファイルを選択し、**OK** をクリックする。



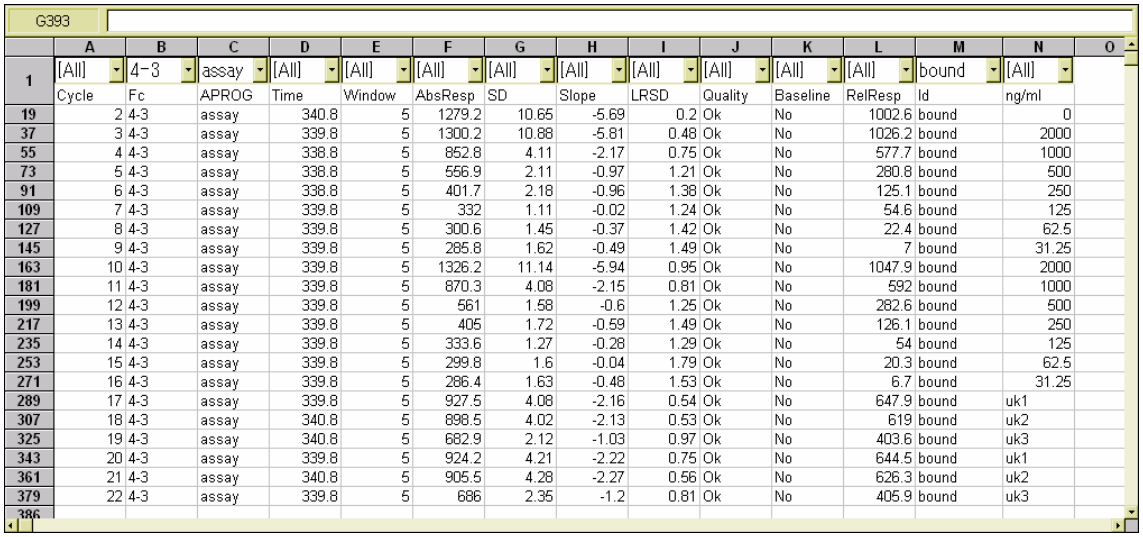
ボックスの **RPoint Table Only** をチェックし、**OK** をクリックする。

A1 Cycle

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
1	[All]	[All]	assay	[All]	[All]	[All]	[All]	[All]	[All]	[All]	[All]	[All]	[All]	[All]	
	Cycle	Fc	APROG	Time	Window	AbsResp	SD	Slope	LRSD	Quality	Baseline	RelResp	Id	ng/ml	
8	2	1	assay	80.5	5	16176.7	0.08	0	0.09	Ok	Yes	0	baseline	0	
9	2	2	assay	80.6	5	18234.4	0.16	0.05	0.15	Ok	Yes	0	baseline	0	
10	2	3	assay	80.7	5	16100.4	0.16	-0.02	0.17	Ok	Yes	0	baseline	0	
11	2	4	assay	80.8	5	16377	0.18	-0.02	0.19	Ok	Yes	0	baseline	0	
12	2	2-1	assay	80.6	5	2057.6	0.24	0.1	0.17	Ok	Yes	0	baseline	0	
13	2	4-3	assay	80.8	5	276.6	0.21	-0.05	0.21	Ok	Yes	0	baseline	0	
14	2	1	assay	340.5	5	16174.1	0.11	-0.03	0.11	Ok	No	-2.5	bound	0	
15	2	2	assay	340.6	5	18236.1	2.37	-1.18	0.96	Ok	No	1.7	bound	0	
16	2	3	assay	340.7	5	16112.7	9.07	-4.74	2.12	Ok	No	12.3	bound	0	
17	2	4	assay	340.8	5	17409.7	19.7	-10.46	2.54	Ok	No	1032.7	bound	0	
18	2	2-1	assay	340.6	5	2061.1	1.18	-0.62	0.26	Ok	No	3.5	bound	0	
19	2	4-3	assay	340.8	5	1279.2	10.65	-5.69	0.2	Ok	No	1002.6	bound	0	
20	2	1	assay	923.5	5	16171.8	0.19	-0.06	0.17	Ok	No	-4.9	regeneration	0	
21	2	2	assay	923.6	5	18223.8	0.21	0.09	0.14	Ok	No	-10.6	regeneration	0	
22	2	3	assay	923.7	5	16095.2	0.18	0.02	0.19	Ok	No	-5.2	regeneration	0	
23	2	4	assay	923.8	5	16367.7	0.21	0.07	0.18	Ok	No	-9.2	regeneration	0	
24	2	2-1	assay	923.6	5	2052	0.26	0.13	0.08	Ok	No	-5.6	regeneration	0	
25	2	4-3	assay	923.8	5	272.6	0.27	0.12	0.18	Ok	No	-4	regeneration	0	
26	3	1	assay	79.5	5	16174.4	0.1	0.02	0.1	Ok	Yes	0	baseline	2000	
27	3	2	assay	79.6	5	18228.4	0.19	0.01	0.21	Ok	Yes	0	baseline	2000	
28	3	3	assay	79.7	5	16098.6	0.09	0	0.1	Ok	Yes	0	baseline	2000	
29	3	4	assay	79.8	5	16372.6	0.19	-0.07	0.14	Ok	Yes	0	baseline	2000	
30	3	2-1	assay	79.6	5	2054	0.15	0.04	0.15	Ok	Yes	0	baseline	2000	
31	3	4-3	assay	79.8	5	274	0.2	-0.07	0.17	Ok	Yes	0	baseline	2000	
32	3	1	assay	339.5	5	16163.4	0.45	-0.22	0.19	Ok	No	-10.9	bound	2000	
33	3	2	assay	339.6	5	18230.6	3.81	-1.96	1.19	Ok	No	2.2	bound	2000	
34	3	3	assay	339.7	5	16109.8	11.38	-5.97	2.42	Ok	No	11.2	bound	2000	
35	3	4	assay	339.8	5	17430.9	20.78	-11.01	3.01	Ok	No	1058.3	bound	2000	
36	3	2-1	assay	339.6	5	2064.7	1.17	-0.6	0.34	Ok	No	10.6	bound	2000	
37	3	4-3	assay	339.8	5	1300.2	10.88	-5.81	0.48	Ok	No	1026.2	bound	2000	
38	3	1	assay	924.5	5	16169.7	0.18	0	0.2	Ok	No	-4.7	regeneration	2000	

4-2-2. データの抽出

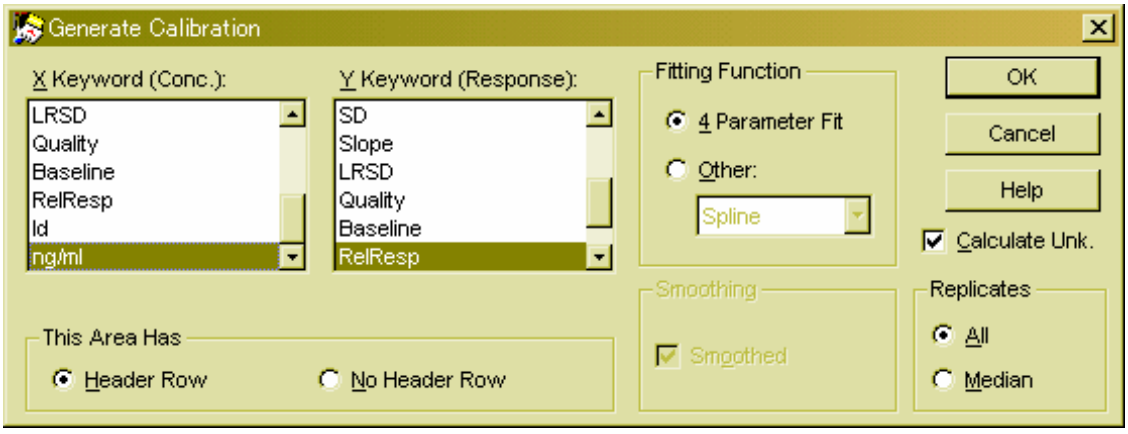
各カラムの上段にフィルター （表示されていない場合は、**Data → Filter**）を利用し、必要な情報だけを抽出する。Fc のカラムには濃度測定を行ったセルに、Id の項目は結合量（RU）を示すレポートポイント名である bound を選択する。



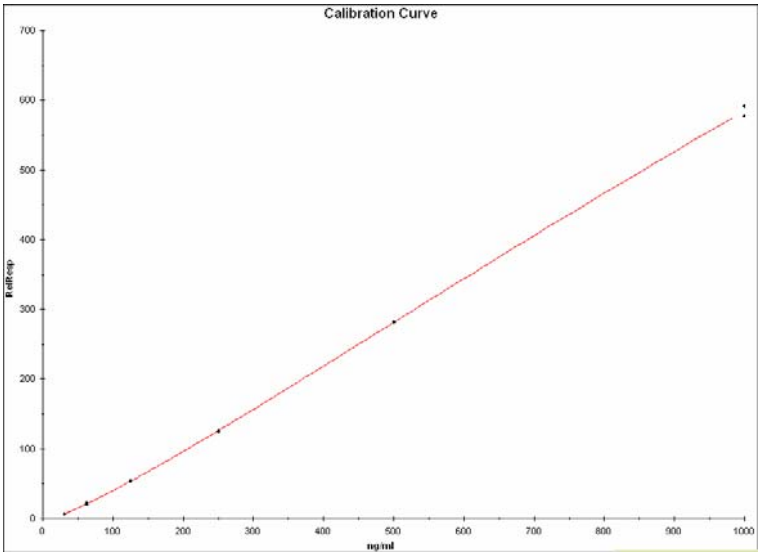
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	[All]	4-3	assay	[All]	[All]	[All]	[All]	[All]	[All]	[All]	[All]	[All]	bound	[All]
	Cycle	Fc	APROG	Time	Window	AbsResp	SD	Slope	LRSD	Quality	Baseline	RelResp	Id	ng/ml
19	2	4-3	assay	340.8	5	1279.2	10.65	-5.69	0.2	Ok	No	1002.6	bound	0
37	3	4-3	assay	339.8	5	1300.2	10.88	-5.81	0.48	Ok	No	1026.2	bound	2000
55	4	4-3	assay	338.8	5	852.8	4.11	-2.17	0.75	Ok	No	577.7	bound	1000
73	5	4-3	assay	338.8	5	556.9	2.11	-0.97	1.21	Ok	No	280.8	bound	500
91	6	4-3	assay	338.8	5	401.7	2.18	-0.96	1.38	Ok	No	125.1	bound	250
109	7	4-3	assay	339.8	5	332	1.11	-0.02	1.24	Ok	No	54.6	bound	125
127	8	4-3	assay	339.8	5	300.6	1.45	-0.37	1.42	Ok	No	22.4	bound	62.5
145	9	4-3	assay	339.8	5	285.8	1.62	-0.49	1.49	Ok	No	7	bound	31.25
163	10	4-3	assay	339.8	5	1326.2	11.14	-5.94	0.95	Ok	No	1047.9	bound	2000
181	11	4-3	assay	339.8	5	870.3	4.08	-2.15	0.81	Ok	No	592	bound	1000
199	12	4-3	assay	339.8	5	561	1.58	-0.6	1.25	Ok	No	282.6	bound	500
217	13	4-3	assay	339.8	5	405	1.72	-0.59	1.49	Ok	No	126.1	bound	250
235	14	4-3	assay	339.8	5	333.6	1.27	-0.28	1.29	Ok	No	54	bound	125
253	15	4-3	assay	339.8	5	299.8	1.6	-0.04	1.79	Ok	No	20.3	bound	62.5
271	16	4-3	assay	339.8	5	286.4	1.63	-0.48	1.53	Ok	No	6.7	bound	31.25
289	17	4-3	assay	339.8	5	927.5	4.08	-2.16	0.54	Ok	No	647.9	bound	uk1
307	18	4-3	assay	340.8	5	898.5	4.02	-2.13	0.53	Ok	No	619	bound	uk2
325	19	4-3	assay	340.8	5	682.9	2.12	-1.03	0.97	Ok	No	403.6	bound	uk3
343	20	4-3	assay	339.8	5	924.2	4.21	-2.22	0.75	Ok	No	644.5	bound	uk1
361	21	4-3	assay	340.8	5	905.5	4.28	-2.27	0.56	Ok	No	626.3	bound	uk2
379	22	4-3	assay	339.8	5	686	2.35	-1.2	0.81	Ok	No	405.9	bound	uk3

4-2-3.検量線の作成

Data → Generate Calibration をクリックする。



X Keyword に **ng/ml** を、Y Keyword に **RelResp** を設定し、**OK** をクリックする。



検量線が作成される。

4-2-4.未知濃度の算出

サンプル濃度の算出は、グラフ左の

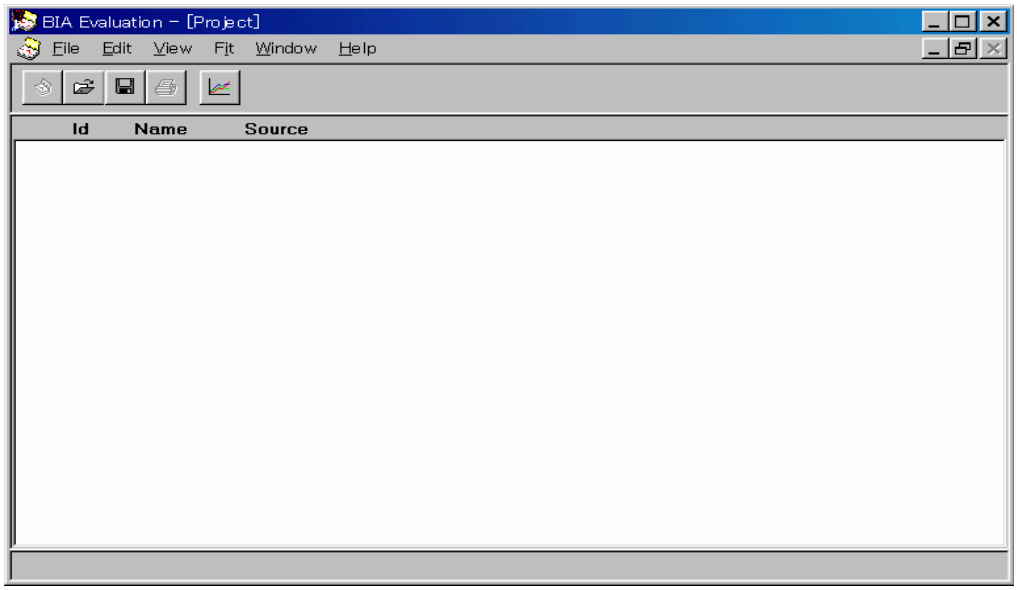
をクリックする。

Cycle	Unknown	RelResp	Calc ng/ml	%cv ng/ml
17	uk1	647.9	1111.032	
20	uk1	644.5	1104.956	
AVG.		646.2	1107.994	0.39
18	uk2	619	1059.71	
21	uk2	626.3	1072.606	
AVG.		622.65	1066.158	0.86
19	uk3	403.6	696.179	
22	uk3	405.9	699.92	
AVG.		404.75	698.049	0.38

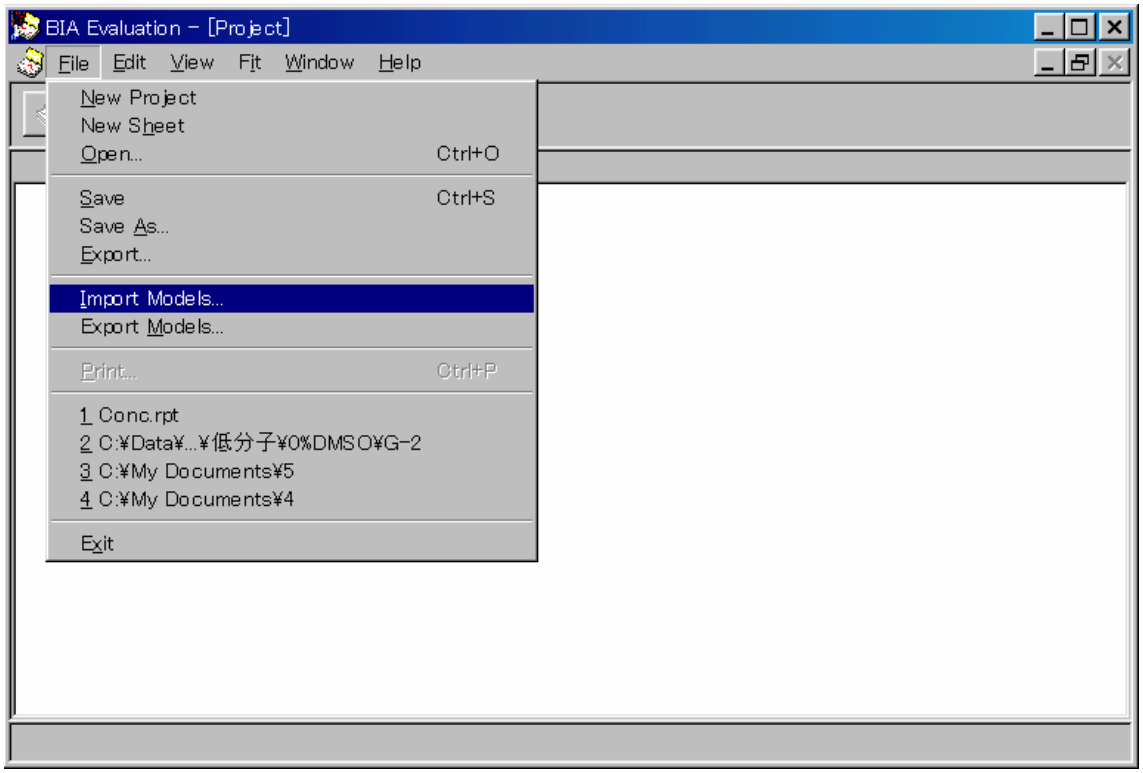
サンプルの濃度は、**Calc.ng/ml** のカラムに表示される。また、同一サンプルの濃度測定を複数回行った場合には **AVG.**として平均値、2 回以上で測定を行った場合には CV 値も表示される。

5. モデルの追加

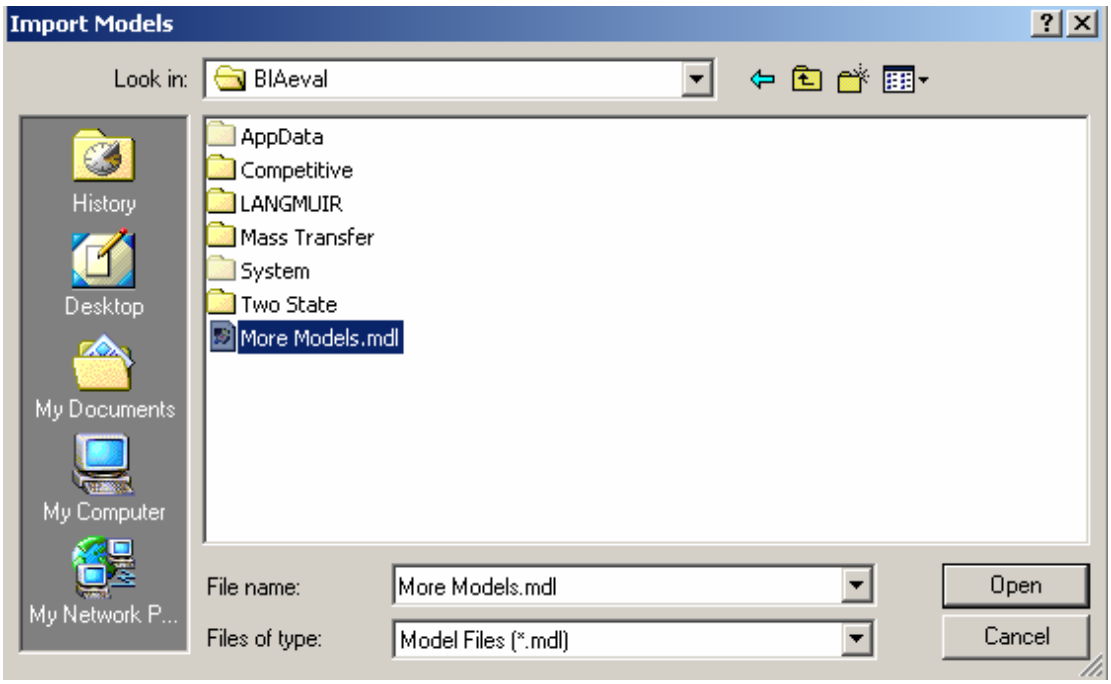
BIAevaluation を立ち上げる。



File → **Import Models...**を選択する。

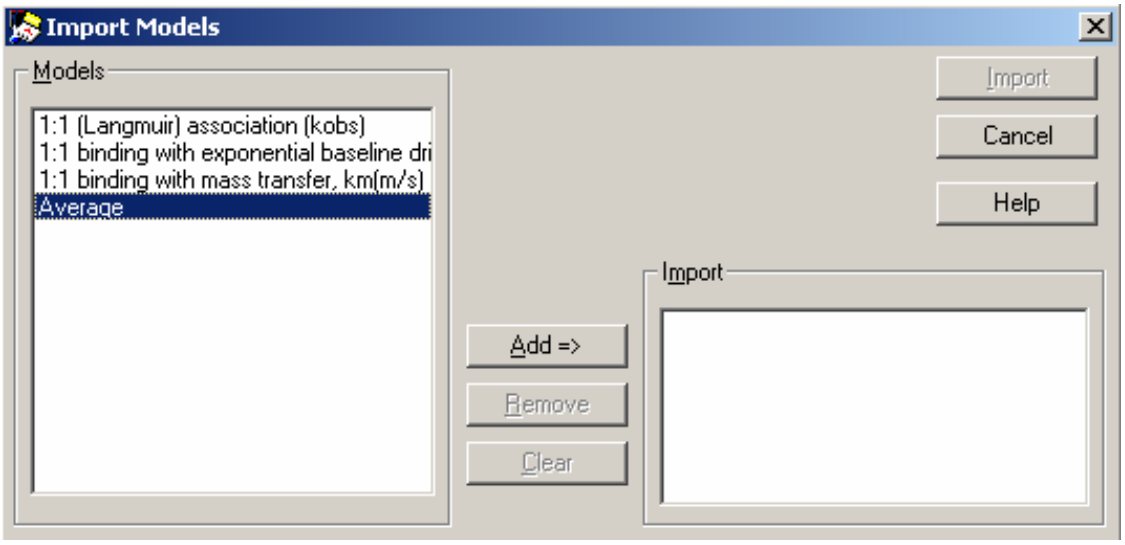


ファイル C:/Program files/BIAeval/ **More Models.mdl** を選択する。



Open する。

追加するモデルを選択する。



Add=>をクリックした後、**Import** をクリックすると、新しいモデルが追加される。

安全上のご注意

必ずお守りください

このしおりには、弊社機器に関する一般的な注意事項を記載しています。取扱いの詳細は必ず製品添付の使用説明書をご覧ください。

誤った取扱いをした場合に生じる危険や損害の程度を、次の区分で説明しています。

警告　誤った取扱いをした場合に、死亡や重傷を負う可能性があるもの。

注意　誤った取扱いをした場合に、傷害または物的損害が発生する可能性があるもの。

図記号の意味は次の通りです。

禁止　⃠は、してはいけない「禁止」を示します。

❗は、必ず実行していただく「強制」を示します。

警告

禁止

電源プラグの抜き差しにより、運転を停止しない

火災・感電の原因になります。

禁止

電源コードを途中で接続しない、タコ足配線をしない

火災・感電・故障の原因になります。

禁止

電源コード・電源プラグを傷つけない

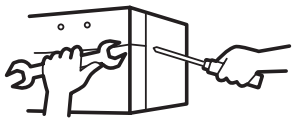
●加工しない　●束ねない　●ねじらない
●折らない　●物をのせない　●加熱しない
●無理に曲げない

破損して火災・感電の原因になります。

禁止

修理・分解・改造はしない

火災・感電の原因になります。



根元まで差込む

電源プラグのほこりを取り除き、刃の根元まで確実に差込む

接続が不十分だと、隙間にほこりが付着して火災・感電の原因になります。

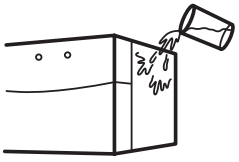
指定の規格

取扱説明書に指定された規格のコンセントを使用する

指定された規格以外で使用すると火災・感電の原因になります。

禁止

本体を水につけたり、水をかけたりしない



ショート・感電の原因になります。

禁止

電源コードや電源プラグが傷んだり、コンセントの差し込みがゆるいときは使わない

感電・ショート・発火の原因になります。

禁止

使用時や使用直後（運転停止後約60分間）は、操作に関係のない部位には触れない

高温部に触れ、やけどの原因になります。

プラグを抜く

異常時は、運転を停止して電源プラグを抜く

異常のまま運転を続けると火災・感電の原因になります。

禁止

同梱の電源コード・電源プラグ以外のコード・プラグを使用しない

故障・火災・感電の原因になります。

禁止

同梱の電源コード・電源プラグを他の電気機器に使用しない

故障・火災・感電の原因になります。

⚠ 注意

禁 止

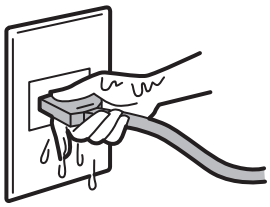
設置時は、次のような場所には置かない

●不安定な場所　●湿気やほこりの多い場所
●油煙や湯気が当たる場所
●直射日光の当たる場所　●風雨のあたる場所
●熱器具の近く　●高温になる場所
●吸・排気口をふさぐような場所

このような場所に置くと、ショートや発熱、電源コードの被膜が溶けるなどして、火災や感電、故障、変形の原因になることがあります。

禁 止

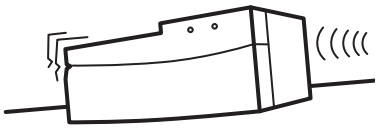
ぬれた手で電源プラグを抜き差しをしない



感電の原因になります。

水平

水平で丈夫な場所に設置する



プラグを持つ

電源プラグを持ってまっすぐ引き抜く

ななめに引き抜いたり、コードを持って抜くと、プラグの刃や芯線が破損してショート・感電・発火の原因になります。

⚠ 低温室で使用する場合の注意

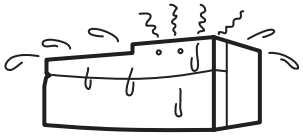
電源を
入れておく

装置を低温環境下でご使用になる場合、システム電源は常時入れておく

低温環境下で長時間システムの電源を落とした状態で放置すると、結露などにより故障の原因になります。
ランプなどの消耗品は OFF にしておくと、劣化を防ぐことができます。

電源を
入れない

装置を低温室から常温の場所に移動させる場合、常温に設置後、装置内の結露が無くなるまでシステム電源を入れない（状況により異なるが、通常半日から一昼夜）



感電・漏電火災の原因になります。

弊社製品についてのお問合せ　（バイオダイレクトライン）

TEL：03-5331-9336

受付時間 9：00 ～ 17：30
土・日・祝日、弊社指定休業日、年末年始を除く

www.gelifesciences.co.jp

e-mailで最新情報をお届けしています。お申込みは上記Webサイト右上の「メール会員登録」から。

© 2009 GE ヘルスケア バイオサイエンス株式会社　本書の全部または一部を無断で複写複製することは、著作権法上の例外を除き、禁じられています。
掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載されている内容は予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。
掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。

GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社

本 社　〒169-0073
東京都新宿区百人町3-25-1 サンケンビルヂング

お問合せ：バイオダイレクトライン
TEL : 03-5331-9336　FAX : 03-5331-9370
e-mail : Tech-JP@ge.com

ISO 9001:2000認証取得

取扱店